



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**“DISTRIBUCIÓN DE GLUCOCORTICOIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
ADMINISTRADOS POR VÍA INTRANASAL”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

IVÁN NICOLÁS PÉREZ OSORIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M.

COMITÉ TUTOR: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
FACULTAD DE CIENCIAS, U.N.A.M.
DRA. GOHAR GEVORKIAN MARKOSIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M.

CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**“DISTRIBUCIÓN DE GLUCOCORTICOIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
ADMINISTRADOS POR VÍA INTRANASAL”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

IVÁN NICOLÁS PÉREZ OSORIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M.

COMITÉ TUTOR: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
FACULTAD DE CIENCIAS, U.N.A.M.
DRA. GOHAR GEVORKIAN MARKOSIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M.

MÉXICO, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2019

OFICIO CPCB/802/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de mayo del 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **PÉREZ OSORIO IVAN NICOLAS** con número de cuenta **306267503** con la tesis titulada "**DISTRIBUCIÓN DE GLUCOCORTICOIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL ADMINISTRADOS POR VÍA INTRANASAL**", realizada bajo la dirección de la **DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE**:

Presidente: DRA. HELGI HELENE JUNG COOK
Vocal: DRA. AGNÉS ODILE FLEURY
Secretario: DRA. GOHAR GEVORKIAN MARKOSIAN
Suplente: M. EN C. TERESITA CORONA VÁZQUEZ
Suplente: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de julio del 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, U.N.A.M.

A los proyectos de CONACyT SALUD-2013-01-201448, DGAPA-UNAM IN211917, DGAPA-UNAM IN201116 y al Programa Institucional de Investigación para el “Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del IIB” (PROVACADI).

A los miembros del comité tutor Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, Dra. Gohar Gevorkian Markosian y Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille.

Agradecimientos

En especial a la Dra. Edda Sciutto, por todo su apoyo y gran asesoría durante la realización de mi trabajo. Pero, sobre todo, por la confianza depositada en mí a cada momento, cuando las cosas no fueron nada bien, esa confianza me ayudó a salir adelante, muchas gracias.

A mi familia, por siempre apoyarme y estar conmigo incondicionalmente.

A Fernanda, por siempre haber estado ahí para escucharme y apoyarme.

A mis compañeros Alejandro, Manuel, Brandon, Laura, Juan por sus consejos y apoyo durante mi trabajo, por los buenos momentos que siempre pasé en el laboratorio.

A Jacquelynne Cervantes y Gabriela Meneses, por sus consejos durante los experimentos realizados, sin duda fundamentales.

A Marisela, por su ayuda en todos los trámites realizados.

A Gina, muchas gracias por ser parte fundamental no solo de mi proyecto, sino del laboratorio en general, sin tu trabajo, dedicación y consejos no habría podido realizar mi trabajo.

A Patricia Padilla, otro pilar de esta tesis, gracias por las charlas, los consejos, el apoyo durante los tiempos difíciles y sobre todo, gracias por el excelente trabajo realizado en tu laboratorio, aprendí muchísimo a tu lado.

A Miguel Tapia, por su colaboración durante los análisis imagenológicos realizados, tu trabajo fue fundamental para lograr la imagen de terminó siendo portada.

A Juan Carlos, mi primer alumno, gracias por permitirme transmitir algo de lo poco que sé. Sobre todo, gracias por las charlas y todo lo que yo terminé aprendiendo de ti, sé que tendrás un gran futuro académico, persevera.

A Olga y Juan Carlos, el apoyo que directa e indirectamente me brindaron ha sido de las cosas que más he valorado, muchas gracias.

A Adriana López, por ser la mejor secretaria que haya conocido, de verdad que sin su ayuda no habría podido iniciar ni terminar el posgrado.

A la Dra. María de los Angeles Herrera Campos, por su apoyo fundamental para poder terminar el proceso de titulación, sin él, no habría podido terminar el posgrado.

A mis amigos, Daniel, José Antonio, Gabriel, Johan, Oscar Araujo, Melisa, Lorena, Manuel, Oscar, Daniel Reyes, por los grandes momentos que siempre pasamos, las risas y los recuerdos regados a lo largo de los años. Sobre todo, por el apoyo cuando la vida se puso difícil.

A mis padres Lilia y Nicolás, por su amor y apoyo incondicional, ser mi más grande ejemplo en la vida y alentarme siempre a llegar muy lejos, los amo.

A mi familia, abuelitos Mauro, Carmen y Chelo, tíos Lety, Mauro, Leonel y Elena, Liani mi hermana querida, Diego y Cachetito. Ya que cada palabra aquí redactada y cada instante de mi vida los lleva a ustedes detrás.

A ti, hermosa compañera, sabes que, sin ti nada de esto sería posible. Fernanda, eres tú la que con tu amor y apoyo me diste la fuerza para seguir adelante y cerrar este ciclo. Te dedico el que hasta hoy es el logro más grande en mi vida, te amo.

“La constancia es la clave del éxito”

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Marco teórico	
Vías de administración de fármacos.....	3
Vía de administración intranasal.....	4
Glucocorticoides.....	5
Administración intranasal de glucocorticoides.....	6
Justificación.....	7
Hipótesis.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares.....	8
Materiales y métodos	
Unidad experimental.....	8
Distribución e intensidad de fluorescencia media de dexametasona en cerebro y médula espinal.....	8
Concentración de dexametasona en suero sanguíneo y sistema nervioso central.....	9
Análisis <i>in vivo</i> de biodisponibilidad de dexametasona.....	10
Análisis estadístico Interacción celular de la dexametasona.....	10
Resultados	
Distribución e intensidad de fluorescencia media de dexametasona en cerebro y médula espinal.....	12
Concentración de dexametasona en suero sanguíneo y sistema nervioso central.....	16
Análisis <i>in vivo</i> de biodisponibilidad de dexametasona.....	18
Interacción celular de la dexametasona.....	19
Discusión.....	24
Conclusiones.....	27
Bibliografía.....	28

Resumen

Los glucocorticoides son fármacos con una potente actividad antiinflamatoria derivados del ciclopentano perhidrofenantreno. Uno de estos fármacos es la dexametasona, glucocorticoide que ha sido ampliamente utilizado por sus altas capacidades para modular la inflamación. Sin embargo, se ha reportado que la constante exposición a altas dosis de este tipo de fármacos genera diferentes efectos secundarios que perjudican al paciente sobre todo cuando se ocupan para disminuir la neuroinflamación, ya que su paso al sistema nervioso central está restringido por la barrera hematoenfálica, dando como resultado un mayor contacto sistémico que deriva en la aparición de los ya mencionados efectos secundarios. Por ello en nuestro grupo de trabajo se ha propuesto el uso de la vía de administración intranasal como una alternativa a la vía de administración intravenosa, ya que se ha reportado que por dicha vía los fármacos administrados pueden alcanzar de manera más rápida y eficiente el sistema nervioso central. De igual manera, hemos encontrado evidencia experimental que sugiere que la administración intranasal de metilprednisolona es mejor para el tratamiento de los brotes de esclerosis múltiple remitente recurrente que la administración del mismo fármaco de manera intravenosa, así mismo se ha demostrado que la administración intranasal de dexametasona permite la recuperación motriz y la disminución de la zona de infarto en un modelo murino de evento cerebrovascular.

Poco se ha descrito sobre la distribución que los fármacos administrados por vía intranasal tienen dentro del sistema nervioso central, en particular dentro del cerebro. Mucho menos se ha descrito la distribución que glucocorticoides como la dexametasona tienen en el cerebro luego de su administración nasal, situación que es poco favorable para futuras investigaciones, ya que si se sabe cómo se distribuye el fármaco dentro de este órgano, se puede proponer su uso administrándolos por la vía nasal como tratamiento a neuropatologías que involucren inflamación focalizada en las zonas de distribución del fármaco.

Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo es determinar la distribución de la dexametasona dentro del sistema nervioso central. Para ello, se comparó la administración de una dosis de 0.25 mg/kg de dexametasona por la vía intranasal con su administración por la vía intravenosa a ratones C57BL/6 macho de 8 a 12 semanas de edad. Habiendo transcurrido 24 horas de su administración se analizó cualitativamente la presencia de dexametasona en cerebro mediante inmunofluorescencia contra el fármaco, así mismo se hizo un análisis de biodisponibilidad *in vivo* mediante el sistema "In vivo Extream Bruker". Para cuantificar la concentración de dexametasona presente en el cerebro de los organismos se hizo una cinética de cuantificación comparando ambas vías de administración, analizando las muestras obtenidas a los 15, 60, 180 minutos después de la administración del fármaco.

Se encontró que la vía de administración intranasal permite una mayor incorporación de dexametasona al cerebro que si se administra por la vía intravenosa. Aunado a esto, la biodisponibilidad del fármaco dentro del cerebro parece ser mayor cuando se administra intranasalmente. Una vez que estas diferencias fueron evaluadas, se evaluó la distribución del fármaco dentro del cerebro. Se encontró que la distribución es principalmente en corteza cerebral y zonas adyacentes al núcleo estriado, así como en bulbos olfatorios.

El presente trabajo sienta las bases para dilucidar con mayor detalle en futuros estudios la distribución dentro del sistema nervioso central no solo de la dexametasona sino también de otro tipo de glucocorticoides.

Abstract

Glucocorticoids are drugs with a potent anti-inflammatory activity derived from cyclopentane perhydrofenanthrene. One of these drugs is dexamethasone, a glucocorticoid that has been widely used for its high capacities to modulate peripheral inflammation derived from different conditions ranging from musculoskeletal pain to autoimmune diseases. However, it has been reported that constant exposure to this type of drugs generates different side effects that harm the patient, especially when they are used to reduce neuroinflammation, since their passage to the central nervous system is restricted by the blood-brain barrier, resulting in a greater systemic contact that leads to the appearance of the aforementioned side effects. Therefore, in our working group the use of the intranasal administration route has been proposed as an alternative to the intravenous administration route, since it has been reported that the administered drugs can reach the central nervous system more quickly and efficiently. Coupled with this, we have found experimental evidence suggesting that intranasal administration of methylprednisolone is better for the treatment of seizures associated with Recurrent Remitting Multiple Sclerosis than intravenous administration of the same drug, as well as intranasal administration of dexamethasone allows motor recovery and decrease of the infarct zone in a murine model of cerebrovascular event.

Although it is already known the advantages that the intranasal administration route offers with respect to the administration of different molecules, little has been described about the distribution that drugs can have within the central nervous system, particularly within the brain after having been administered intranasally. Much less has been described the distribution of glucocorticoids such as dexamethasone in the brain after intranasal administration, a situation that is unfavorable for future research, because if you know how the drug is distributed within of the brain can be proposed the use of glucocorticoids administered by the nasal route as a treatment to neuropathologies that involve focal inflammation in the distribution areas of the drug.

Therefore, the main objective of this work is to determine the distribution of dexamethasone within the central nervous system. For this, the administration of a dose of 0.25 mg / kg of dexamethasone by the intranasal route was compared with its intravenous administration to male C57BL/6 mice from 8 to 12 weeks old. Twenty-four hours after administration, the presence of dexamethasone in the brain was analyzed qualitatively by immunofluorescence against the drug, and an *in vivo* bioavailability analysis was carried out using the "*In vivo* Extream Bruker" system. To quantify the concentration of dexamethasone present in the brain of the organisms, quantification kinetics was made by comparing both administration routes, analyzing the samples obtained at 15, 60, 180 minutes and after the administration of the drug.

It was found that a higher amount of dexamethasone reaches the brain via intranasal administration than if administered intravenously, in addition to this the bioavailability of the drug within the brain seems to be higher when administered intranasally. Once it was determined that there are differences between the two routes of administration, the distribution of the drug within the brain was evaluated. It was found that the distribution is mainly in cerebral cortex and zones adjacent to the striated nucleus, as well as in olfactory bulbs.

The present work lays the basis to elucidate in greater detail in future studies the distribution within the central nervous system not only of dexamethasone but also of another type of glucocorticoids.

Marco teórico

Vías de administración de fármacos

La vía de administración es la ruta de entrada del medicamento al organismo, la cual influye en la latencia, intensidad y duración del efecto del fármaco¹.

Actualmente estas vías de administración de fármacos se engloban en tres grandes grupos, vía enteral, parenteral y tópica².

La vía de administración enteral es la más usada de todas, gracias a que es de fácil ejecución, segura, económica y frecuentemente la más conveniente. Esta se puede dividir a su vez en la vía oral, sublingual y rectal y el tiempo de latencia generalmente oscila entre los 5 a los 30 minutos. Todas estas vías, salvo la oral, tienen la ventaja de que evaden el metabolismo hepático favorecido por el transporte del fármaco a través de la vena porta hacia el hígado, además de que la absorción a través de las mucosas es muy rápida, pero con la desventaja de que las dosis que se pueden administrar son bajas. Por otro lado, es posible tener una serie de efectos secundarios que van desde la irritación de las mucosas hasta posibles intoxicaciones y pérdida de flora intestinal dependiendo de qué fármaco se esté administrando^{3,4,5,6,7}.

Por su parte la vía parenteral se puede dividir en administración intravenosa (IV), intramuscular, subcutánea, intraarterial, intraarticular, intratecal e intradérmica, en donde el tiempo de acción disminuye considerablemente con respecto a la administración enteral, teniendo como tiempo promedio de 30 segundos a 20 minutos dependiendo de la vía utilizada, con excepción de la vía subcutánea en la que este tiempo puede ser más largo. De manera general, este tipo de vías de administración permiten administrar dosis altas de fármaco independientemente del vehículo en el que se encuentre reconstituido; comparando dicha concentración con las otras vías de administración, permiten una alta biodisponibilidad del mismo, favorecen a una rápida y uniforme absorción, además de que no se lleva a cabo el metabolismo de "primer paso" como en la vía enteral. Aunado a esto hay ciertas ventajas en lo particular, como inserción de implantes subcutáneos, administración de fármacos anticancerígenos que funcionan mejor si se administran por vía intraarterial, tratamientos contra la artritis mediante el uso de drogas antiinflamatorias intraarticularmente. En contraste, hay una serie de desventajas con respecto a la vía parenteral que incluyen la posibilidad de desarrollar tromboflebitis, se necesita asistencia técnica para su ejecución para no causar daños musculares o nerviosos, algunas veces son caros y dolorosos y el paciente tiene cierto peligro de infección^{6,8,9,10}.

Por último, la vía de administración tópica, la cual involucra la administración de los fármacos directamente sobre la piel, incluye también estructuras que estén íntimamente ligadas a la piel. Para su empleo, se han desarrollado cremas, geles, parches y nebulizadores entre otros vehículos. Tienen la ventaja de que los efectos terapéuticos a nivel local son buenos y existe poca probabilidad de efectos secundarios, además, cuando se trata de administración tópica localizada o sistémica el tiempo de acción es en segundos, sin embargo, en general esta aplicación tiene un tiempo de acción que va desde algunos minutos, en promedio 10, hasta varias horas y si se necesitan efectos a nivel sistémico rápidos, este tiempo puede ocasionar problemas en el tratamiento^{6,11,12,13,14}.

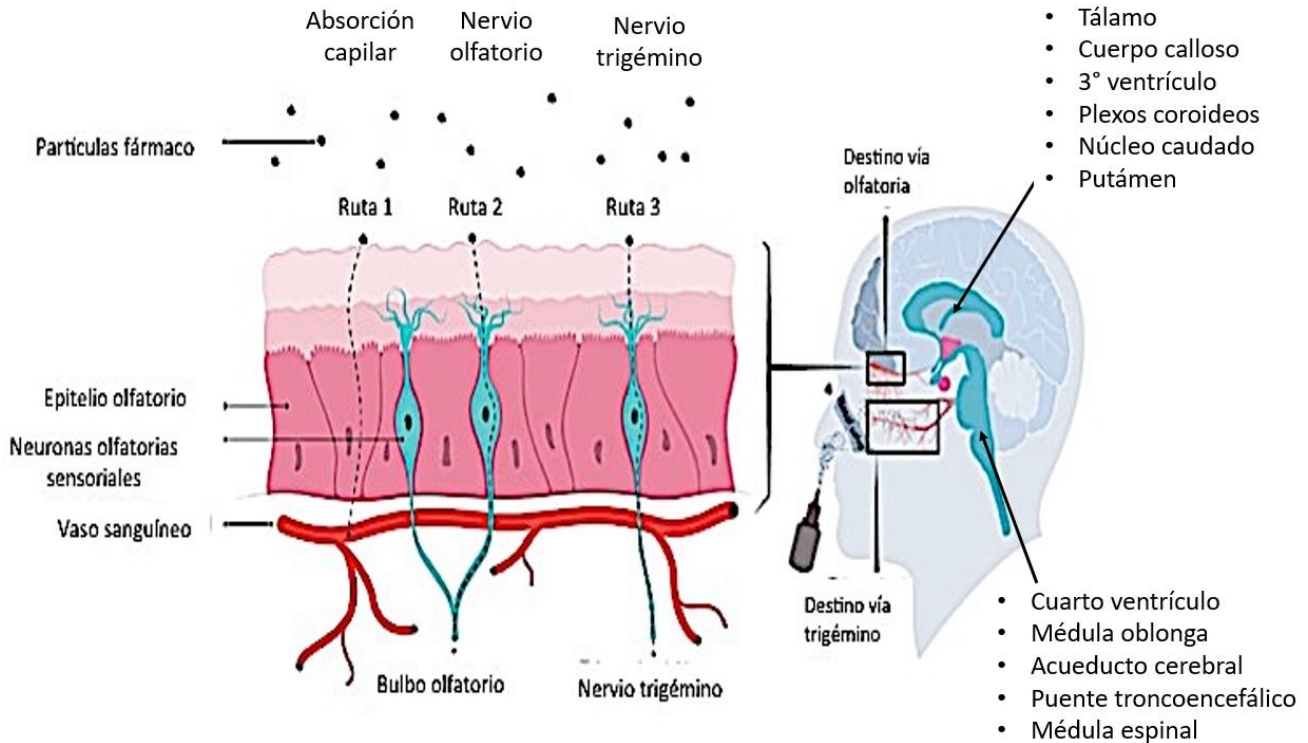
Vía de administración intranasal

Las vías previamente mencionadas tienen ventajas y desventajas, características que deben ser tomadas en cuenta dependiendo del tratamiento que se quiera llevar a cabo. Cuando este tratamiento se enfoca en hacer llegar fármacos al SNC las vías de administración convencionales tienen desventajas notables, en general debido a las condiciones fisiológicas normales del SNC, en particular a la barrera hematoencefálica (BHE)¹⁵. Esta BHE está formada principalmente por dos diferentes tipos celulares, células endoteliales y células de muro que se distribuyen a lo largo de la capa de células endoteliales y que incluyen células de músculo liso, pericitos y algunos autores incluyen en este rubro a los astrocitos ya que disponen su pie astrocitario alrededor de la vasculatura del SNC. Además, las células endoteliales están unidas por uniones estrechas que se encargan de mantener un lumen intercelular de 0.25 μm entre cada célula endotelial y así limitar el flujo paracelular de moléculas y iones^{16,17,18,19,20}. De este modo, independientemente de la vía de administración que se haya elegido, para que los fármacos alcancen el SNC tienen que librar la BHE. Esta circunstancia obliga a que se tengan que administrar dosis muy elevadas para poder así promover el paso del fármaco, un ejemplo de esto es el diazepam, cuya dosis es de 5 mg/Kg de peso. Para tratar de facilitar aún más este paso, se han implementado estrategias como el uso de vehículos acarreadores que crucen la BHE con el fármaco dentro de ellos y lo lleven dentro del SNC, entre los más usados se encuentran acarreadores lipídicos, poliméricos y proteicos entre otros. Sin embargo, no todos los fármacos pueden ser acarreados de esta manera y su éxito dependerá en gran medida de la vía de administración que se esté utilizando ya que hay que librar los diferentes compartimentos del cuerpo antes de llegar a estar en contacto con la BHE^{21,22,23,24,25}. En particular, para administrar glucocorticoides (GC) en el SNC, la vía de administración más utilizada es la IV, que tiene la desventaja de que entre mayor sea la dosis administrada mayores efectos secundarios adversos se presentarán en el paciente, y si el tratamiento contempla repetidas administraciones, el daño al sistema vascular es mayúsculo²⁶. De este modo, es importante hacer notar que se necesitan vías de administración alternas para poder administrar fármacos al SNC, particularmente GC.

Una de estas vías de administración alternas es la vía intranasal (IN). Esta vía se caracteriza porque las moléculas administradas a través de ella pueden llegar al SNC sin necesitar cruzar la BHE, lo que permite, entre otras cosas, disminuir la concentración del fármaco administrado y llegar al SNC mucho más rápido, ya que una de las formas de garantizar que los GC alcancen el SNC es administrando dosis elevadas de GC por vía IV, esto bajo la lógica de que entre mayor sea la dosis administrada más fármaco logrará cruzar la BHE, si se logra evitar la BHE entonces se podrá disminuir la dosis de administración. Aunado a esto, es posible tratar de combinar alguno de los acarreadores previamente mencionados con mecanismos de liberación prolongada de maneras relativamente sencillas, por ejemplo, utilizando hidrogeles. En ellos, el fármaco es liberado en relación directamente proporcional a la degradación de su acarreador, de modo que al final de su degradación, el fármaco se habrá liberado en su totalidad dentro del organismo aumentando su biodisponibilidad^{19,27,28}.

A pesar de que la vía IN es una vía poco estudiada, hay datos que muestran de manera parcial el mecanismo de acción de esta vía^{19,21-24}. Estas investigaciones mencionan que las moléculas administradas por la vía IN, toman en general tres caminos dentro del organismo receptor. El primero es hacia el sistema digestivo en donde pasan a través del intestino hacia el torrente sanguíneo, habiendo sido expuestas previamente a una degradación en el estómago. El segundo es el sistema respiratorio, en donde los pulmones reciben al fármaco en cuestión y después entran al torrente sanguíneo. El tercer camino es hacia el SNC, en donde principalmente hay dos rutas. La primera es a

través de la vasculatura adyacente a la cavidad nasal y la segunda a través de los nervios olfatorio y trigémino. En ambos casos el flujo de dichas moléculas evade la BHE^{16,19,20,22}.



Esquemización de las rutas de llegada de fármacos al SNC después de su administración IN. Modificado de Dhuria *et al.*, 2010. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354916304841>.

De este modo, esta vía se presenta como una buena alternativa para hacer llegar GC al SNC. Sin embargo, existe un vacío en cuanto a la información referente a la administración de GC por vía IN se refiere, en particular sobre hacia qué regiones dentro del SNC se dirigen, con qué células interactúan y el efecto sobre de ellas. Por lo que es muy importante llenar estos vacíos para utilizar esa información en futuras investigaciones.

Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) son fármacos con una potente actividad antiinflamatoria derivados del ciclopentano perhidrofenantreno molécula precursora del cortisol²⁹.

Existen GC sintéticos y de producción endógena. Aquellos de producción endógena son muy importantes en el mantenimiento de la homeostasis en casi cada uno de los sistemas del cuerpo humano y en su mayoría derivan del cortisol^{30,31}. El cortisol está involucrado en el funcionamiento del ciclo circadiano, el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas, internalización de la glucosa a adipocitos, fibroblastos y leucocitos, aumenta la filtración glomerular y eliminación del ácido úrico. En el SNC, el cortisol ayuda a mantener el estado de ánimo y una de los GC de producción endógena derivado de la progesterona llamado alopregnanolona tiene actividad neurotrófica y aumenta la actividad GABAérgica^{32,33,34}.

Por su parte, dentro de los GC sintéticos está la dexametasona (Dx). Este fármaco ha sido ampliamente utilizado por sus altas capacidades para modular la inflamación periférica derivada de diferentes padecimientos que van desde dolores osteomusculares hasta enfermedades autoinmunes^{30,35,36}. Sin embargo, se ha reportado que la constante exposición a este tipo de fármacos genera diferentes efectos secundarios que perjudican al paciente sobre todo cuando se ocupan para disminuir la neuroinflamación, ya que su paso al sistema nervioso central está restringido por la BHE, dando como resultado un mayor contacto sistémico que deriva en la aparición de los ya mencionados efectos secundarios^{37,38}.

Por ello, en nuestro grupo de trabajo se ha propuesto el uso de la vía de administración intranasal como una alternativa a la vía de administración intravenosa, ya que se ha reportado que por dicha vía los fármacos administrados pueden alcanzar de manera más rápida y eficiente el SNC. Por ejemplo, hemos encontrado evidencia experimental que sugiere que la administración intranasal de metilprednisolona es mejor para el tratamiento de las crisis asociadas a la esclerosis múltiple remitente recurrente que la administración del mismo fármaco de manera intravenosa, así mismo se ha demostrado que la administración intranasal de dexametasona permite la recuperación motriz y la disminución de la zona de infarto en un modelo murino de evento cerebrovascular.

El mecanismo de acción de los GC no se tiene del todo descrito, ya que no se han desarrollado muchas investigaciones cuyo objetivo sea el dilucidar dicho mecanismo, sobre todo en cuanto al efecto específico de los GC a nivel genómico para suprimir o aumentar la expresión de un gen en especial. Se sabe que una vez que un GC es administrado a un organismo, éste pasa la membrana celular con facilidad. Habiendo sido internalizado, el receptor de GC se separa de las proteínas HSP90 que lo resguardan. Una vez liberado, el receptor capta al GC por la región carboxilo terminal y el complejo receptor-GC es translocado al núcleo. Al estar dentro del núcleo, el receptor libera al GC e interacciona con las regiones GRE así como con los denominados dedos de zinc. De esta manera, surgen los efectos genómicos de los GC, ya que se modifica la transcripción del DNA, la actividad de mRNA y se reorganizan las histonas^{39,40,41,42,43}. Por otro lado, existen los mecanismos de acción no genómicos de los GC, entre los que se encuentran la promoción del estado apoptótico de las células diana, interacciones que desestabilizan la membrana celular y mitocondrial, así como fosforilación de proteínas de shock térmico^{44,45,46}.

Administración intranasal de GC

Se sabe que la administración IN de Dx es eficiente para el control de la neuroinflamación en un modelo murino de sepsis⁴⁷. Así mismo en nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que también es eficaz en el tratamiento para la sintomatología asociada a un EVC en un modelo murino. Sin embargo, aún se tienen que delimitar los mecanismos de acción por los que la Dx está actuando en estos casos.

Al utilizar la vía IN como ruta de administración de GC existen factores a considerar para garantizar su éxito. La población objetivo es uno de ellos, se sabe que el estado clínico del paciente afecta a esta vía de administración, un ejemplo de ello es que alergias o enfermedades que ocasionen incremento en la cantidad de secreción mucosa impedirán que el fármaco administrado permanezca en la cavidad nasal y que pase hacia el torrente sanguíneo, otro aspecto a considerar en la población objetivo es la edad del paciente, ya que es importante que el sujeto adopte diferentes posiciones y las mantenga para garantizar una mejor distribución del fármaco en la cavidad nasal, en general los niños y adultos

mayores tendrían que tener cuidados especiales para garantizar la correcta administración. Otro factor es la interacción entre el GC y estructuras del organismo receptor. En este caso es importante considerar la estructura química del GC a administrar para saber de qué manera interactuará con los diferentes compartimentos estructurales y celulares luego de su administración IN, así mismo para saber que tanto se podrá unir a las distintas proteínas residentes tanto en el torrente sanguíneo como en los tejidos diana^{21,24,48,49,50,51}. En el caso de la Dx, se sabe que tiene alta hidrofobicidad, lo que le permite penetrar membranas con relativa facilidad y que se une en torrente sanguíneo a la albúmina sérica⁵².

Por su parte, la farmacocinética de los GC es un factor fundamental para decidir qué fármaco utilizar en diferentes patologías. Para la Dx, se sabe que es metabolizada principalmente en el hígado, aunque también se metaboliza en el riñón y sus tejidos objetivo, los metabolitos son excretados por vía renal. Presenta un tiempo medio de absorción de 14 minutos con biodisponibilidad de 86%, así como una vida media que va de las 2 hasta las 54 horas post-administración dependiendo de la vía por la que se administre, del paciente y de la concentración de la misma^{53,54,55,56}.

Así mismo, elegir adecuadamente el dispositivo de administración es de suma importancia, ya que se tiene que garantizar que una vez administrado, el fármaco recubra la mayor área posible dentro de la cavidad nasal, tomando en cuenta variables como viscosidad, ángulo de contacto y densidad del GC administrado y a pesar de que se trate de un mismo GC, estos valores dependerán de la presentación del fármaco⁵¹. Generalmente siempre se encuentran en solución o a manera de coloide y pueden estar asociados a hidrogeles o partículas acarreadoras⁵⁷⁻⁵⁹.

Por último, saber cuál es la ruta de absorción y tejidos objetivo del GC administrado es importante para saber qué tipo de GC utilizar en diferentes patologías. En lo que respecta a este apartado, no existen estudios que delimiten claramente la ruta a tomar por los GC, en particular la Dx, después de su administración IN, así como con qué tejidos y células interactúa, una de las razones por las que se lleva a cabo el presente estudio.

Justificación

La vía de administración IN es una vía alternativa de administración de fármacos que tiene diferentes ventajas, sobre todo para el tratamiento de patologías del SNC, ya que se logra evadir la principal barrera que dificulta la llegada de los fármacos hacia él, la BHE. Existen ya diferentes estudios enfocados en utilizar esta vía para administrar fármacos y otras moléculas, así mismo que exponen la dinámica general de una molécula administrada por vía IN. Sin embargo, existen pocos estudios que han involucrado la administración IN de fármacos con objetivo de alcanzar el SNC y en particular GC como la Dx. De este modo la determinación de la ruta que este fármaco toma y con qué tejidos interacciona después de su administración IN es un área con un gran panorama de acción, ya que, si se saben con exactitud estos datos, se podrían proponer tratamientos alternativos para patologías del SNC que presenten procesos neuroinflamatorios. Además, la evidencia sugiere que al menos para el tratamiento de la neuroinflamación asociada a la sepsis y el EVC murina, la administración IN de Dx es mejor que su administración IV.

Por lo anterior, es importante realizar estudios cuyo objetivo sea el de dilucidar la dinámica de la Dx administrada por vía IN en su camino hacia el SNC.

Hipótesis

La administración de Dx por vía IN resultará en una mayor biodisponibilidad dentro del SNC que la administración por la vía IV.

Objetivo general

Analizar la distribución de la dexametasona dentro del sistema nervioso central.

Objetivos particulares

Comparar la distribución dentro del SNC de Dx administrada por las vías IN e IV.

Determinar la concentración de Dx en cerebro.

Evaluar la interacción Dx-célula dentro del SNC.

Materiales y métodos

Unidad experimental

Todos los procedimientos se realizaron en ratones C57BL/6 machos de 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio con ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad y agua y alimento *ad libitum*. Estas condiciones se mantuvieron para el análisis de biodisponibilidad con la diferencia de que el modelo animal utilizado fue ratones nu/nu machos de 8 a 10 semanas de edad.

El presente proyecto fue previamente aprobado por el CICUAL del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Así mismo, el manejo de los animales se llevó a cabo bajo la reglamentación dictada por la NOM-062-ZOO.

Distribución e intensidad de fluorescencia media de dexametasona en cerebro y médula espinal

Se administró Dx marca Alin® (Fosfato sódico de Dexametasona) a una concentración de 0.25 mg/Kg a cada uno de los sujetos experimentales. Se eligió esta concentración por ser la más baja utilizada para la administración humana. La administración se realizó por las vías IN e IV. Se realizó el sacrificio de los animales 24 horas post-administración.

El sacrificio se efectuó mediante una perfusión por punción cardiaca reportada previamente⁴⁷. Una vez concluido el procedimiento, se almacenaron los cerebros y médula espinal en paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C.

Habiendo transcurrido 24 horas, se realizaron cortes histológicos en cada uno de los cerebros y médulas espinales almacenados. En la figura 1 se representan las regiones en las que se realizaron estos cortes que fueron de 30 µm de grosor para determinar dónde se distribuye el fármaco. Para ubicar de mejor manera las regiones en donde se realizaron los cortes, se ubicaron diferentes distancias con respecto a Bregma. Estos cortes se realizaron en un criostato Leica CM3050.

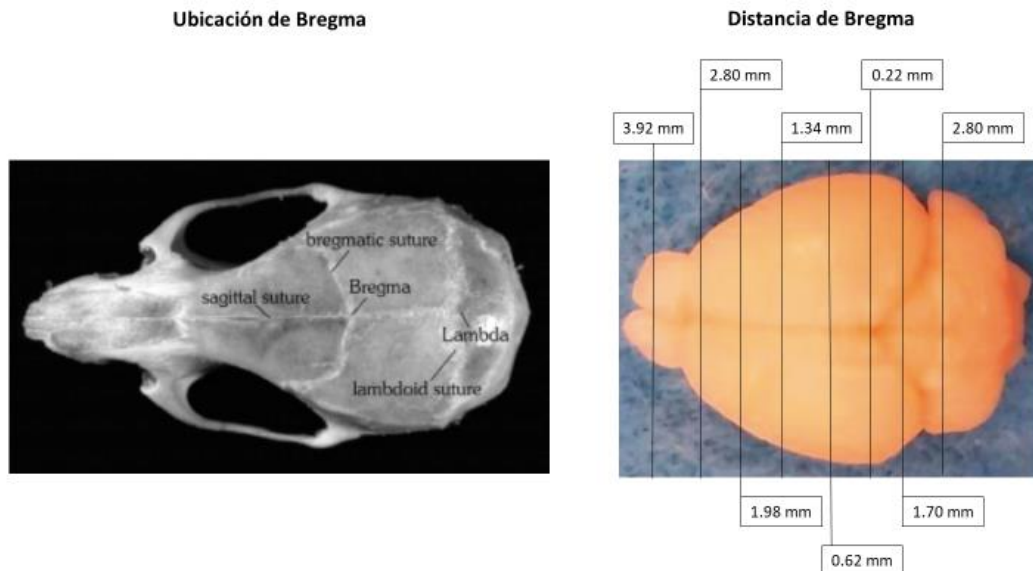


Figura 1. Ubicación con respecto a Bregma de los cortes histológicos realizados.

Se realizó un procedimiento de inmunodetección por fluorescencia en cada corte realizado según el protocolo reportado previamente⁴⁷, con algunas modificaciones. Para ello, se utilizó un anticuerpo contra Dx (Abcam, ab35000) a una dilución de 1:250 el cual se acopló a un anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (ThermoFisher, A-11012) en una dilución de 1:250, contrastando los núcleos celulares con DAPI (ThermoFisher, P36931).

Una vez concluido este procedimiento, se tomaron fotografías en diferentes zonas de los cortes de manera aleatoria utilizando un microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

El área de cobertura y la intensidad de fluorescencia media (IFM) fueron calculadas utilizando el software Image J. El cálculo del porcentaje de cobertura del fármaco se determinó tomando en cuenta todo el corte como referencia del 100% de área.

Concentración de dexametasona en suero sanguíneo y sistema nervioso central

Para el análisis de HPLC se tomaron muestras de cerebro y suero de los ratones a los 15, 60 y 180 minutos después de la administración IN e IV de Dx, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Una vez transcurrido el tiempo post-administración, se tomó la muestra de sangre desde el seno venoso retroorbitario obteniendo un volumen de 500 μ l. Se separó el suero de las muestras por centrifugación diferencial a 13,500 rpm y las muestras se congelaron y almacenaron a -20°C hasta su análisis. Este procedimiento se realizó sólo una vez por animal.

Posteriormente los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los cerebros, los cuales se congelaron y almacenaron a -20°C hasta el subsecuente análisis.

La extracción de Dx de las muestras se realizó según lo reportado previamente con algunas modificaciones⁶⁰. Se agregó a cada cerebro un volumen de 500 μ l de etanol y a cada muestra de suero un volumen igual al obtenido de suero, el etanol utilizado fue grado HPLC (Merck, 64-17-5). Luego se

homogenizaron los tejidos con un ultra-sonicador hielscher UP400St a 40 MHz manteniendo siempre la temperatura a 4°C. Los homogenizados resultantes se centrifugaron a 15,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante de cada muestra y se realizó un segundo tratamiento a las muestras en las mismas condiciones que el primero. Por último, se analizó cada muestra por medio de un HPLC fase reversa marca Waters® con detección en UV con una columna C18 Spherisorb ODS2 4.6 X 150 mm (Cat. PSS832113 WATERS), utilizando una fase móvil compuesta de agua-metanol en proporción de 20:80, en donde el agua mantiene una relación 50:50 de agua con acetonitrilo. El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente inyectando cada vez 10 µl con un flujo de 1 ml/min La concentración de Dx se reportó en µg/ml.

Análisis *in vivo* de biodisponibilidad de dexametasona

El análisis de biodisponibilidad de la Dx se realizó utilizando un equipo *In vivo* Xtream Brucker®. Previo a iniciar el procedimiento, se anestesió a cada animal con una mezcla de Ketamina-Xilacina (3:1). Una vez anestesiados, se administró por vía IN e IV a cada ratón una dosis de 0.25 mg/kg de Dx acoplada a fluoresceína. Un análisis inicial se realizó comparando ambas vías de administración a los 10, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Posteriormente se analizó más a fondo la vía IN 1, 15 y 30 minutos. La Dx se leyó a una longitud de onda de 488 nm al tiempo que se obtuvieron imágenes de rayos X de las zonas analizadas. Los valores reportados se muestran en fotones/segundo/mm², valores arbitrarios dispuestos por el equipo.

Interacción celular de la dexametasona

Para determinar con qué tipo de células interactúa la Dx, se realizó una doble tinción por inmunofluorescencia contra GFAP (marcador de astrocitos) ocupando una dilución de 1:1000 (ThermoFisher, 13-0300), al cual se acopló un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, A-11001) a una dilución de 1:250. Por otro lado, también se realizó una tinción contra Iba1 (marcador de microglía) a una dilución de 1:500 (ThermoFisher, PA5-27436), al cual se acopló un anticuerpo secundario Alexa fluor 488 a una dilución de 1:250 (ThermoFisher, 13-0300). Para ambas tinciones, se utilizó anticuerpo contra Dx (Abcam, ab35000) a una dilución de 1:250 el cual se acopló a un anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (ThermoFisher, A-11012) en una dilución de 1:250, contrastando los núcleos celulares con DAPI (ThermoFisher, P36931).

Se realizó un análisis por microscopía confocal en un microscopio Nikon A1R+ STORM mediante el cual se determinó más a detalle la distribución del fármaco dentro de las células. Para ello, se contrastaron los núcleos con DAPI (ThermoFisher, P36931) y se tiñó la Dx utilizando el mismo anticuerpo primario previamente mencionado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico y las representaciones gráficas se realizaron mediante el uso del software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., EUA).

El análisis estadístico de la IFM, de la cobertura la Dx en el cerebro y de la concentración de Dx en cerebro cuantificado por HPLC se realizó aplicando una prueba de ANOVA con un análisis post-hoc de Tukey tomando en cuenta los tratamientos IN e IV de Dx como variable dependiente y los valores de IFM, de cobertura de Dx y de concentración de Dx como variable independiente. El nivel de significancia de todas las pruebas se definió con un error de probabilidad de $p < 0.05$.

Todas las gráficas incluidas en esta tesis presentan valores de error estándar para cada grupo experimental.

Resultados

Distribución e intensidad de fluorescencia media de dexametasona en cerebro y médula espinal

La cobertura de la Dx administrada por vía IN es en todas las regiones analizadas significativamente mayor que la que alcanza con su administración IV (figura 2). Las diferencias de mayor magnitud se observaron a los 0.62 mmBrg a los -2.80 mmBrg. A los 0.62 mmBrg, tanto en la administración IN como IV, la cobertura del fármaco fue mayor en comparación con los otros grupos de cada tratamiento respectivamente. Con valores de $287,603.425 \pm 3473.061 \mu\text{m}^2$ y $24781.548 \pm 2407.327 \mu\text{m}^2$ respectivamente. Ninguna región del tratamiento IV presentó diferencias significativas entre grupos excepto a los 0.62 mmBrg.

Para tener un panorama más general de la cobertura del fármaco en las diferentes regiones, se calculó el porcentaje de cobertura de la Dx tomando como referencia de 100% el corte histológico de cerebro completo. De este modo, las regiones que presentaron diferencias significativas fueron las correspondientes a los 1.34 mmBrg, 0.62 mmBrg y -0.22 mmBrg, en las que los valores de porcentaje de cobertura para el tratamiento IN fueron $1.161 \pm 0.077 \%$, $2.176 \pm 0.237 \%$ y $1.435 \pm 0.146 \%$ respectivamente. El valor de porcentaje de cobertura más alto de nuevo se presentó a los 0.62 mmBrg en el tratamiento IN.

Luego de determinar que en las regiones previamente mencionadas es donde hay una mayor distribución del fármaco administrado por vía IN, se analizó con mayor detalle cómo es esta distribución dentro de la misma región. Se encontró que en las zonas que comprenden tanto el núcleo caudado como corteza se distribuye la mayor parte de la Dx administrada tanto por vía IN como IV. Así mismo, al comparar los valores de IFM de la Dx administrada por las diferentes vías encontrada en el núcleo caudado y corteza, se encontraron diferencias significativas en todas las comparaciones con excepción a la de corteza de la región a 0.22 mmBrg. Por otro lado, la corteza de la región a 0.62 mmBrg presentó la mayor IFM de Dx administrada por la vía IN de todas las regiones, su valor fue de 49.09 ± 2.102 , en contraste con el valor de IFM de la misma zona en la misma región que fue el que menor valor de IFM presentó de todas las regiones analizadas, con un valor de 12.505 ± 0.749 . Con respecto al núcleo caudado, la región a 0.62 mmBrg es la que presentó el mayor valor de IFM de todas las regiones analizadas, su valor fue de 30.348 ± 0.779 (figura 3).

Por su parte, mediante el análisis de IFM (figura 4) de todas las regiones se determinó que sólo en la región a 1.34 mmBrg luego de la administración IN de Dx se presentan diferencias significativas, presentando un valor muy por encima del resto de 21.532 ± 2.597 . Sin embargo, está presente una tendencia en la que los valores de IFM son mayores en la administración IN que en la IV en todas las regiones.

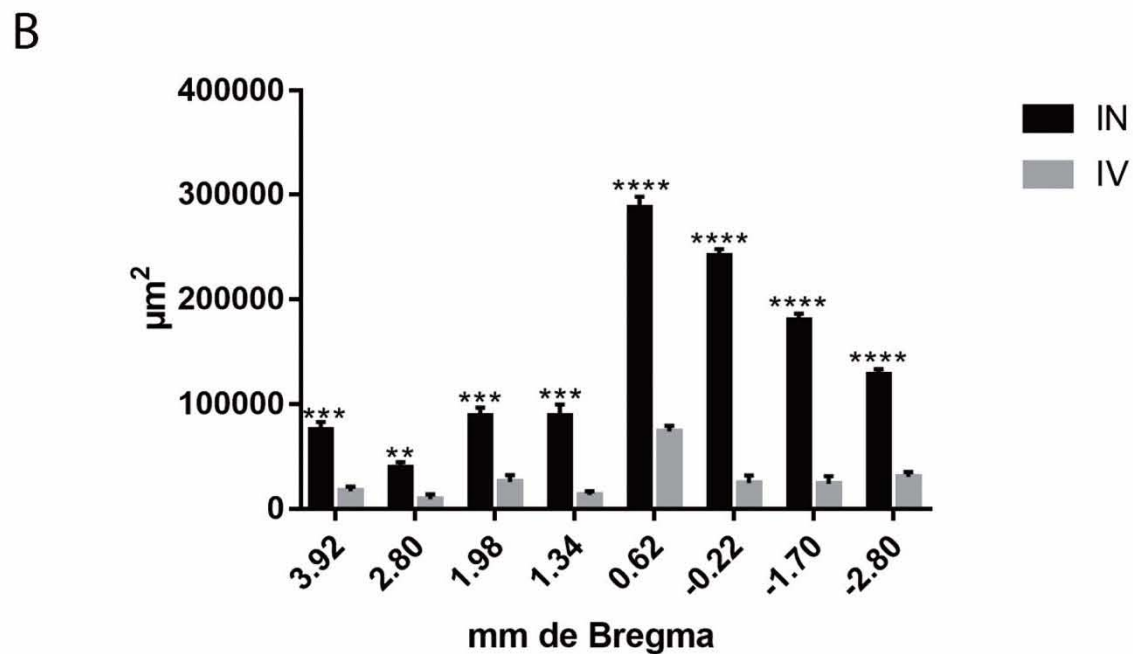
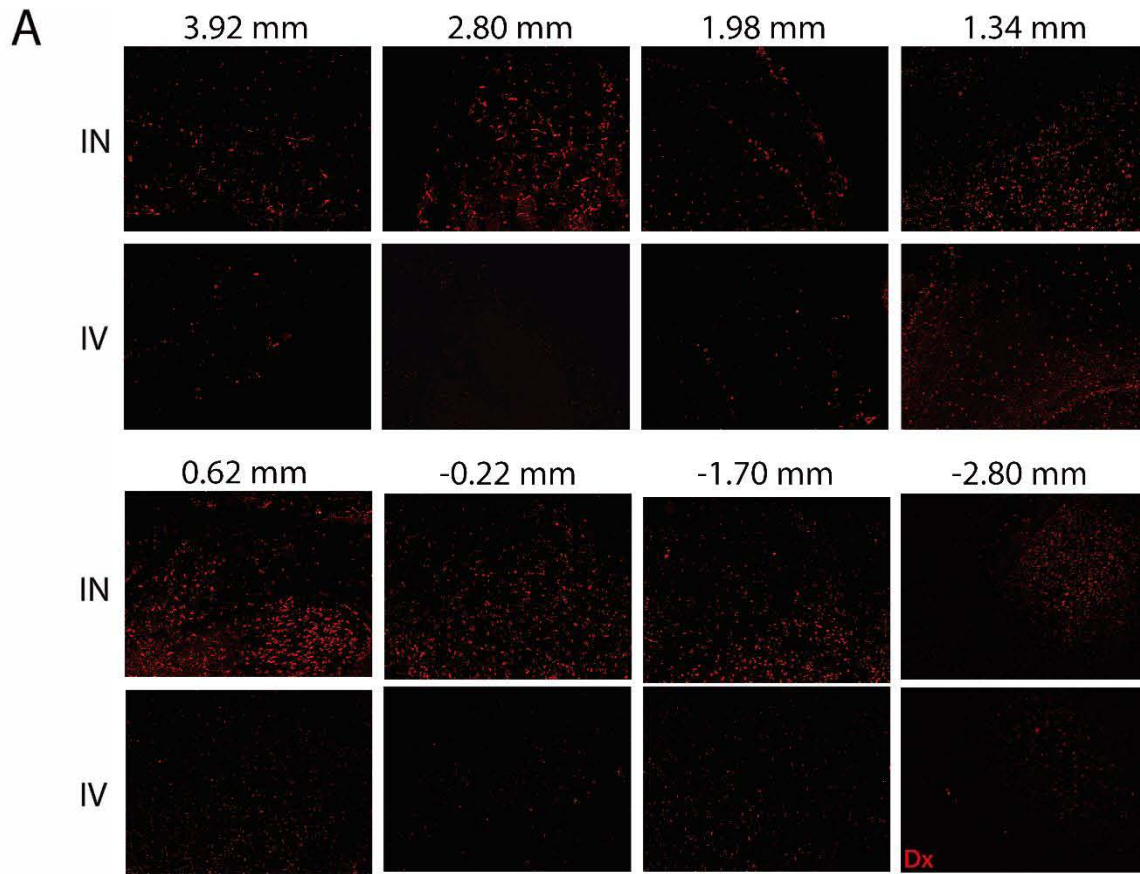
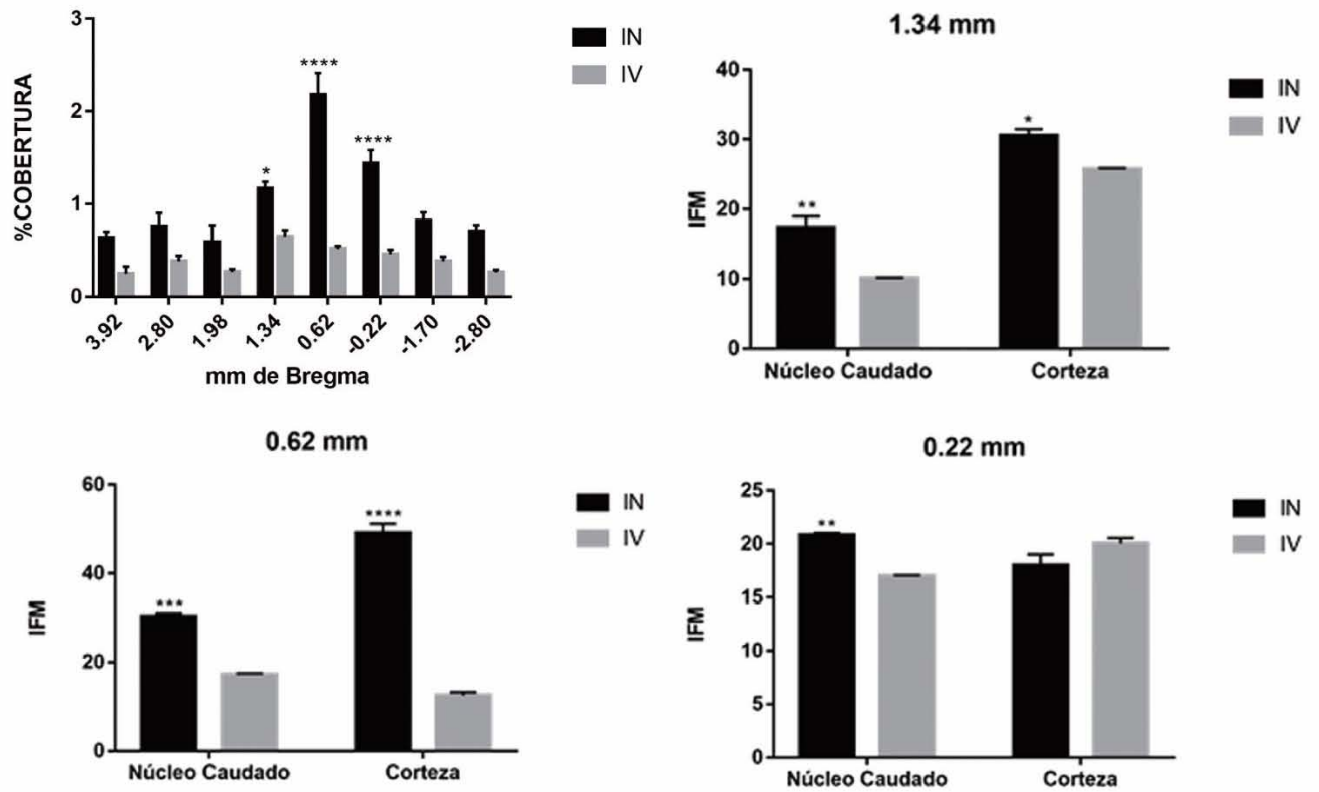


Figura 2. Cobertura de Dx en cortes seriados de cerebro. **A)** Inmunofluorescencias contra Dx en aumento 10X. Dx administrada por la vía IN e IV, se observa de manera gráfica que hay diferencias claras en el área de cobertura de la Dx. El marcaje en rojo muestra la Dx presente en cada corte. **B)** Se observa que en todas las regiones analizadas, el área de cobertura de la Dx es significativamente mayor, $p < 0.05$.

A



B

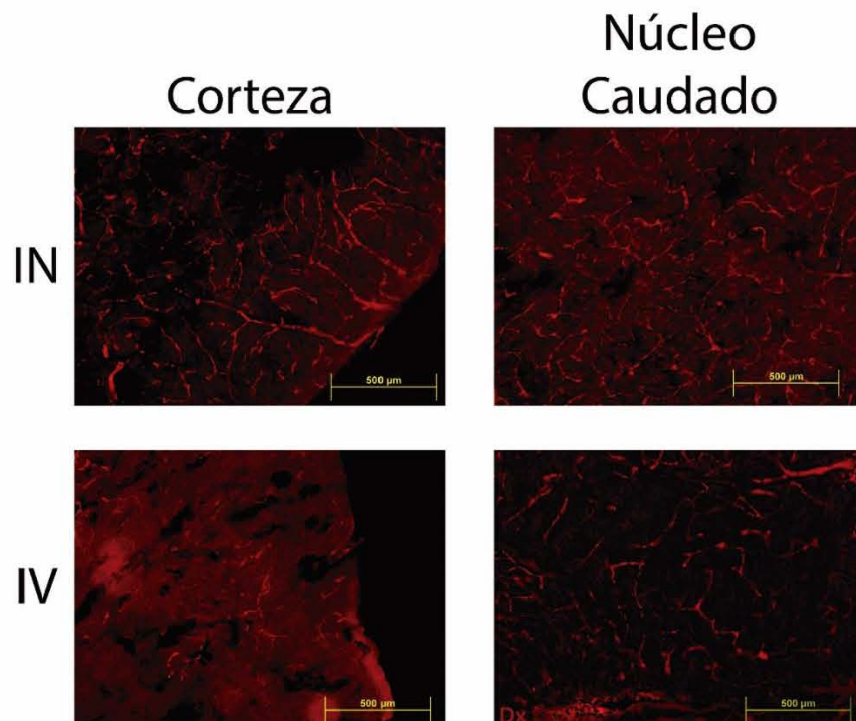


Figura 3. Porcentaje de cobertura de Dx en cortes seriados de cerebro. **A)** Las regiones con un porcentaje de cobertura de Dx significativamente mayor son a 1.34, 0.62 y -0.22 mmBrg; $p < 0.05$. Se muestra también que en cada una de esas regiones hay valores mayores de IFM en núcleo caudado y corteza de Dx administrada por vía IN; $p < 0.05$. **B)** Inmunofluorescencias contra Dx en aumento 20X. Distribución de Dx (en rojo) en corteza y núcleo caudado de cerebro de ratón.

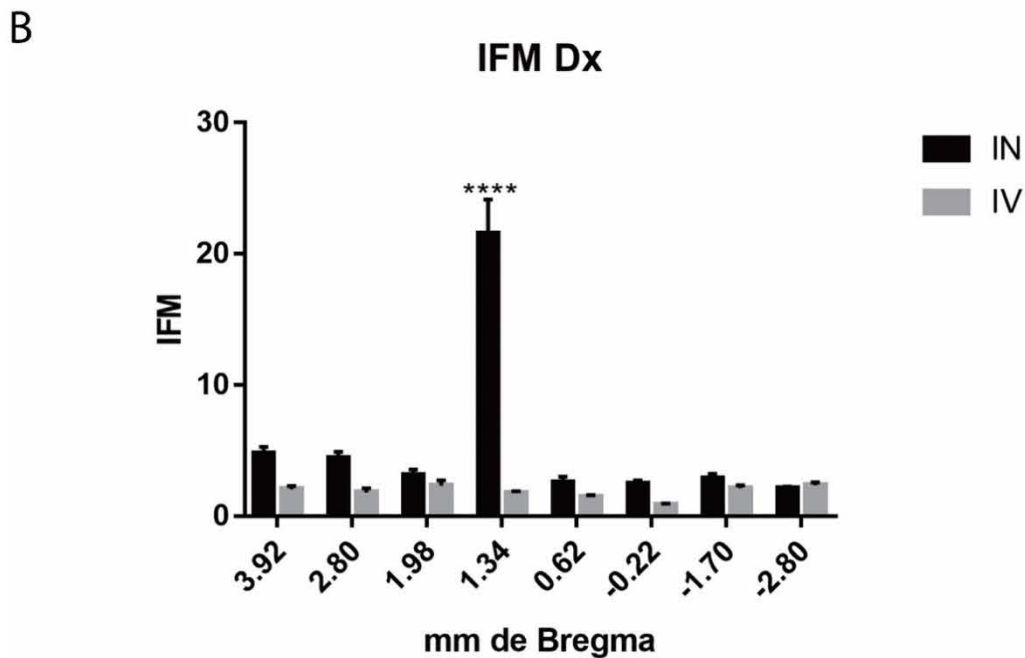
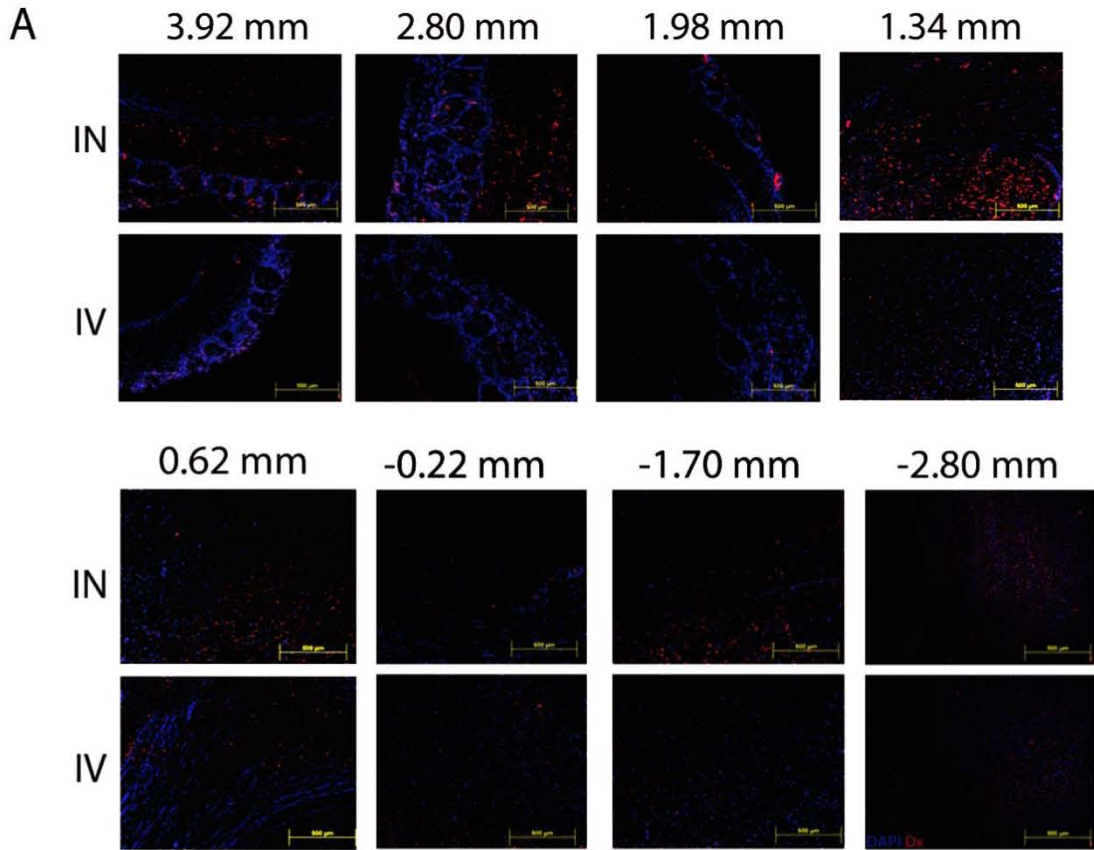


Figura 4. IFM de Dx en cortes seriados de cerebro. **A)** Inmunofluorescencias contra Dx en aumento 10X. Se observa que la región a 1.34 mmBrg es la que más IFM presenta. En rojo se muestra la Dx y en azul núcleos celulares. **B)** Se observa que la única región que presentó diferencias significativas es a 1.34 mmBrg. Por su lado, en todas las demás regiones se observa una tendencia de una mayor IFM de la Dx administrada por vía IN; $p < 0.05$.

Considerando que no se ha reportado a la fecha ningún estudio descriptivo de la distribución de un glucocorticoide en sistema nervioso central posterior a su administración intranasal se evaluó también la presencia de Dx en la médula de los ratones administrados. Se encontraron diferencias significativas en la IFM y en el área de cobertura entre ambas vías de administración (figura 5).

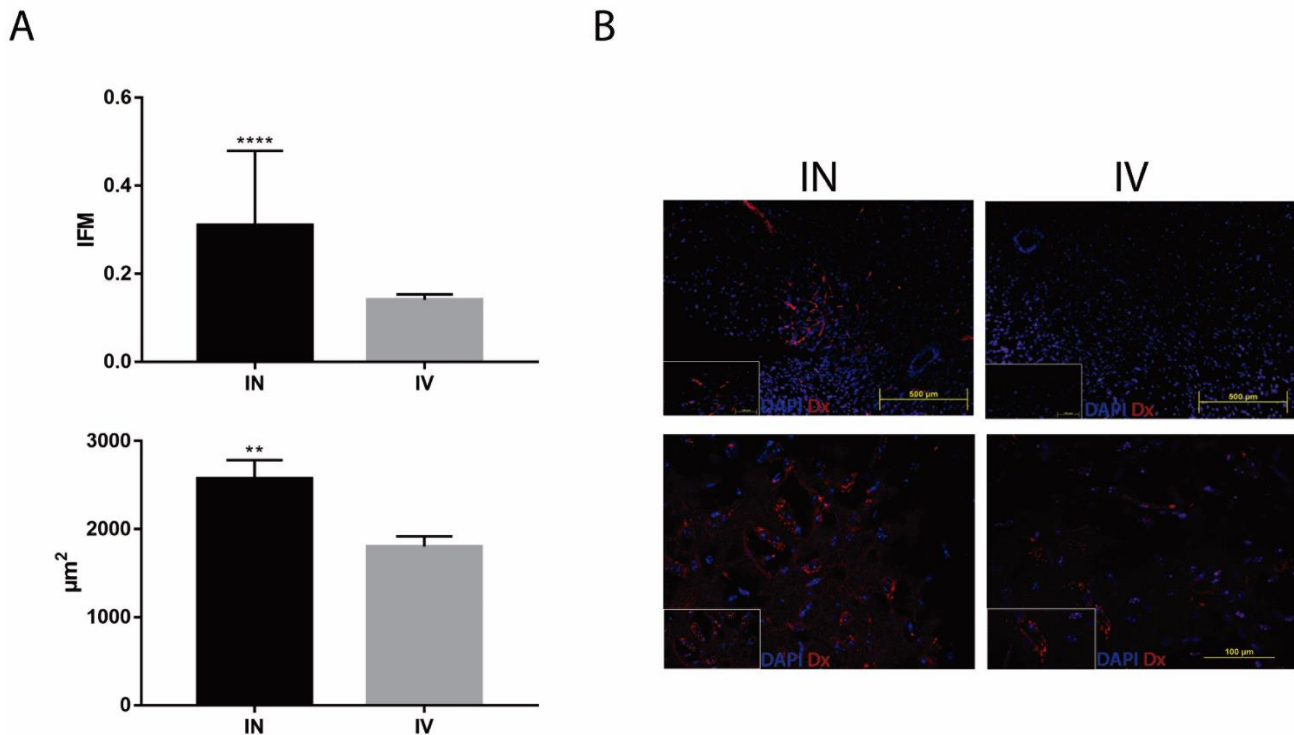


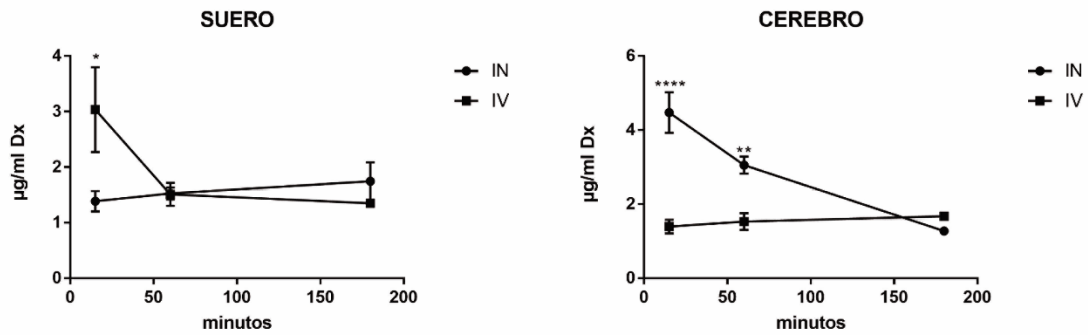
Figura 5. Distribución de Dx en Médula de ratón. **A)** Se observa que tanto en IFM como en área de cobertura de Dx la administración IN promueve valores mayores en la región torácica de la médula espinal; $p < 0.05$. **B)** Inmunofluorescencias contra Dx en aumento 20X. Se muestran en rojo la Dx presente en médula espinal. Se percibe una mayor señal de Dx luego de su administración IN.

Concentración de dexametasona en suero sanguíneo y sistema nervioso central

En la figura 6 se muestra el cromatograma característico de la Dx con un tiempo de retención a los 3.089 minutos. Luego del análisis por HPLC no se encontró Dx en las muestras analizadas a las 10 y 24 horas después de su administración. Se determinó que la concentración de Dx en cerebro después de su administración IN tiene diferencias significativas a los 15 y 60 minutos con respecto a la administración IV. Mientras que en suero sanguíneo estas diferencias sólo se presentan a los 15 minutos. En el comportamiento de la concentración de Dx en cerebro se puede observar que cuando es administrada por vía IV la concentración de Dx aumenta de los $1.393 \pm 0.187 \mu\text{g/ml}$ a los 15 minutos a $1.675 \pm 0.037 \mu\text{g/ml}$ a los 180 minutos, mientras que cuando se administra por la vía IN la concentración va de los $4.474 \pm 0.548 \mu\text{g/ml}$ y baja a los 15 minutos a $1.271 \pm 0.102 \mu\text{g/ml}$. Este comportamiento es contrario al observado en el suero sanguíneo, en donde la concentración de Dx administrada por vía IV va de un valor de $3.035 \pm 0.765 \mu\text{g/ml}$ a $1.348 \pm 0.001 \mu\text{g/ml}$ de 15 a 180

minutos respectivamente, pero si se administra Dx por vía IN los valores de su concentración en suero se mantienen casi sin cambios pero en aumento, con valores a los 15 minutos de $1.385 \pm 0.183 \mu\text{g/ml}$ que se elevan a los $1.744 \pm 0.339 \mu\text{g/ml}$ a los 180 minutos (figura 6).

A



B

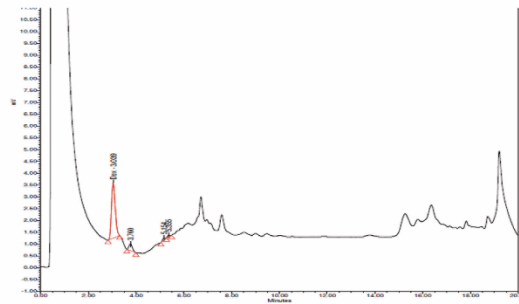


Figura 6. Cinética de concentración de Dx en cerebro y suero sanguíneo de ratón. **A)** Se presenta la concentración de Dx en suero y cerebro de ratón. Se percibe que en el cerebro hay diferencias significativas de la concentración de Dx a los 15 y 60 minutos post-administración, mientras que en el suero solo se presentan a los 15 minutos post-administración; $p < 0.05$. **B)** Cromatograma característico de la detección de Dx por HPLC, $1.25 \mu\text{g/ml}$.

Análisis *in vivo* de biodisponibilidad de dexametasona

El análisis de la biodisponibilidad *in vivo* arrojó datos que se muestran en la figura 7. A los 45 minutos post-administración IV el fármaco se empieza a concentrar en el hígado de los ratones hasta alcanzar un punto máximo a los 120 minutos. La administración IN muestra cambios que indican que la mayor concentración de fármaco se encuentra a los 10 minutos en la parte más craneal de la cavidad nasal de los ratones y al paso del tiempo la cantidad de Dx disminuye es esta zona para incrementar su presencia en el resto de la cavidad nasal y en la región correspondiente al encéfalo de los ratones.

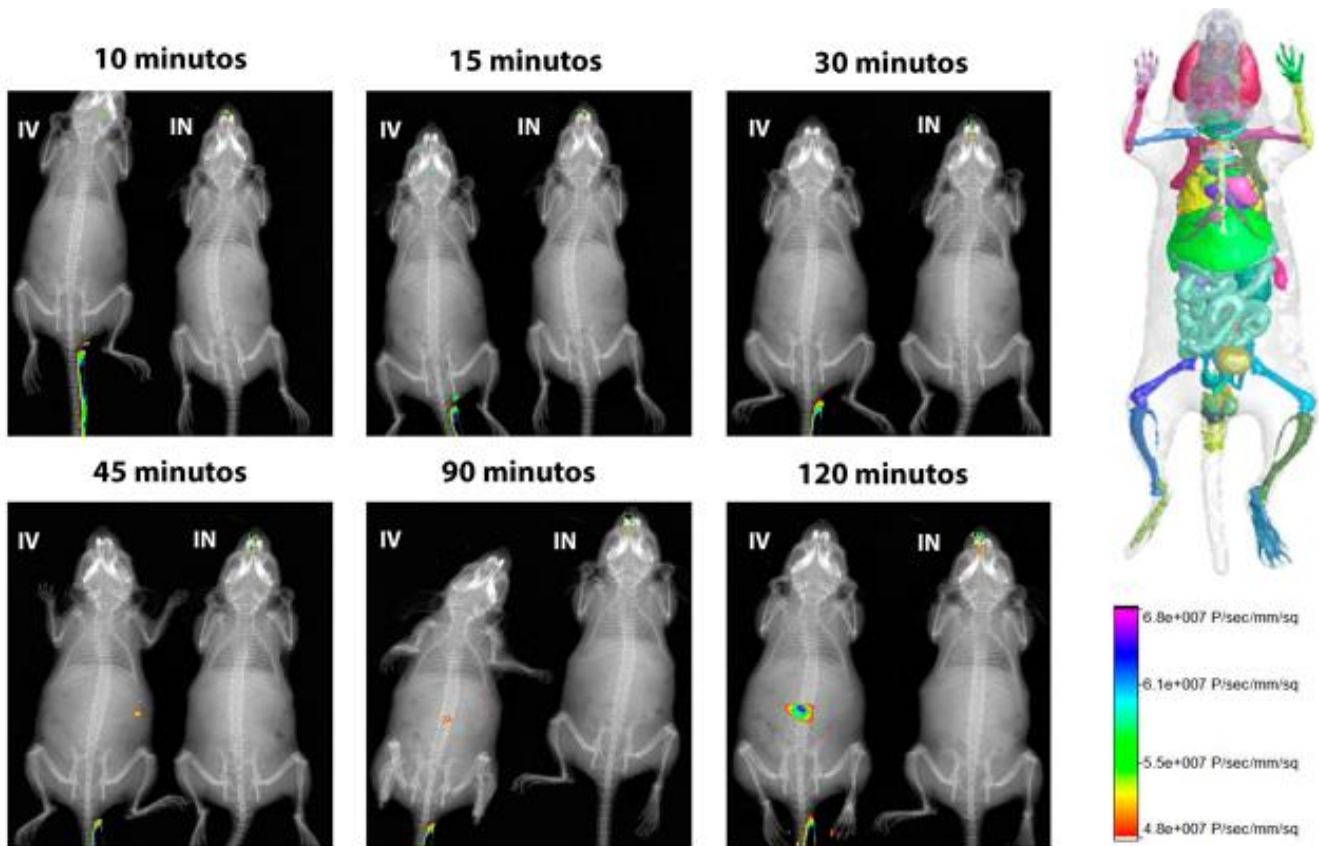


Figura 7. Comparación de la distribución de Dx luego de su administración IN e IV. Se muestra que después de 120 minutos de la administración IV de Dx, esta se empieza a bioacumular en la región hepática.

Para analizar más a detalle la biodisponibilidad de la Dx administrada de manera IN se realizó un segundo análisis haciendo un acercamiento a la región cráneo-dorsal de los ratones. En la fotografía tomada desde una vista ventral, se pudo observar que en el tiempo inicial hay una gran cantidad de Dx presente en la cavidad nasal, al inicio y dentro de ella, mientras que la imagen con perspectiva dorsal permite ver que un minuto después de la administración ya hay Dx presente en el cerebro y en lo que parecen ser los pulmones de los organismos analizados. A los 15 minutos post-administración la cantidad de Dx presente en la cavidad nasal disminuye y aumenta a su punto máximo durante el ensayo tanto en cerebro como en pulmones. Al final, habiendo transcurrido 30 minutos la concentración de Dx disponible en la cavidad nasal disminuye aún más, sin embargo, la concentración de Dx presente en el cerebro y los pulmones disminuyen por debajo incluso de los parámetros obtenidos habiendo transcurrido solo un minuto (figura 8).

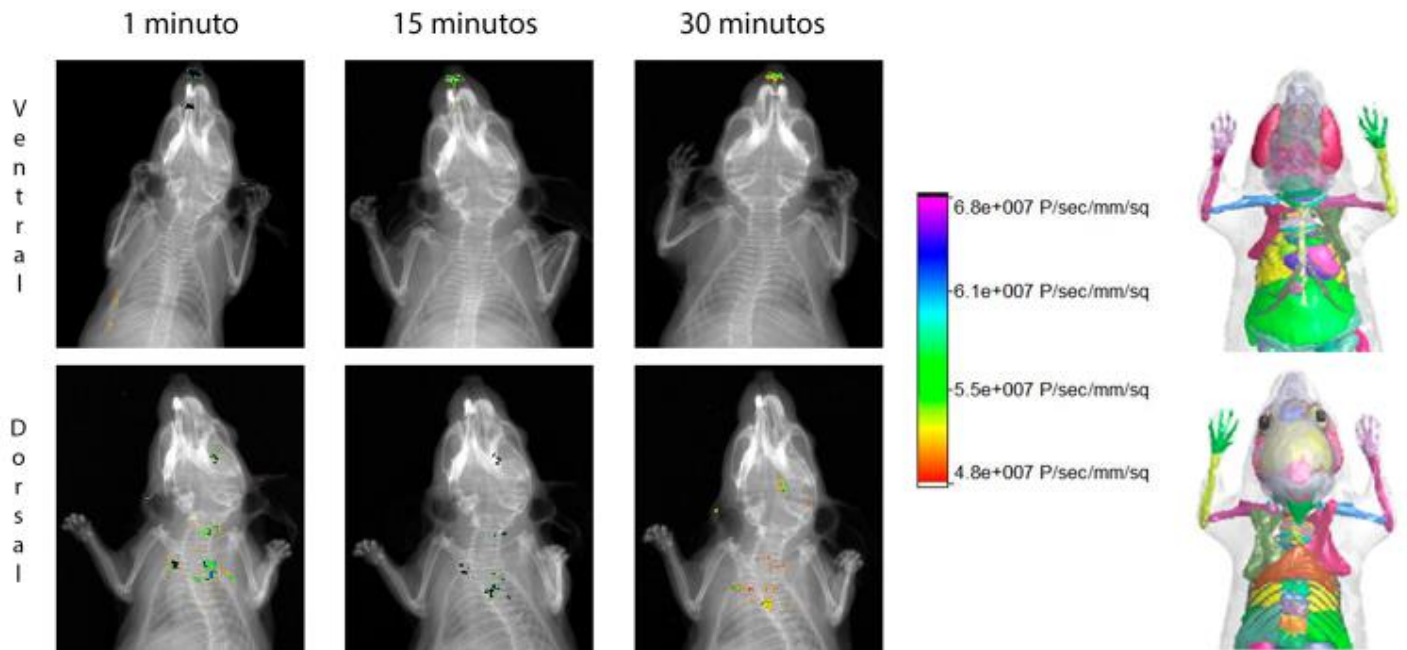


Figura 8. Distribución de Dx luego de su administración IN. Se observan imágenes con vista dorsal y ventral de la llegada de la Dx administrada por vía IN de 1 a 30 minutos. La cantidad de Dx en cavidad nasal va disminuyendo conforme pasa el tiempo, a la vez que aumenta en la región craneal y pulmonar de los organismos.

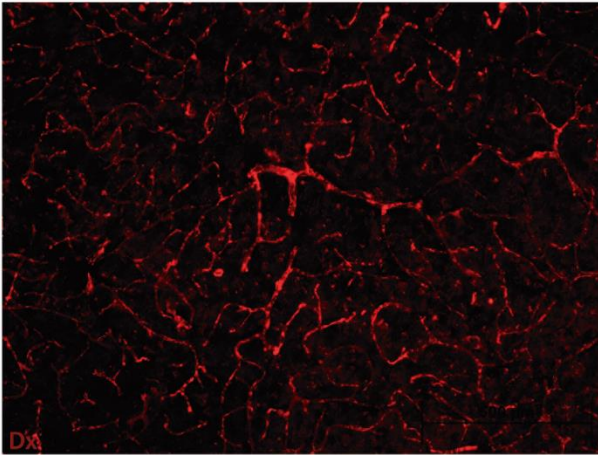
Interacción celular de la dexametasona

El análisis cualitativo de la distribución del fármaco dentro del cerebro mostró que 24 horas post-administración la Dx se puede distribuir dentro de los diferentes tipos celulares pertenecientes al SNC como astrocitos y microglía, así como células endoteliales pertenecientes a la vasculatura cerebral.

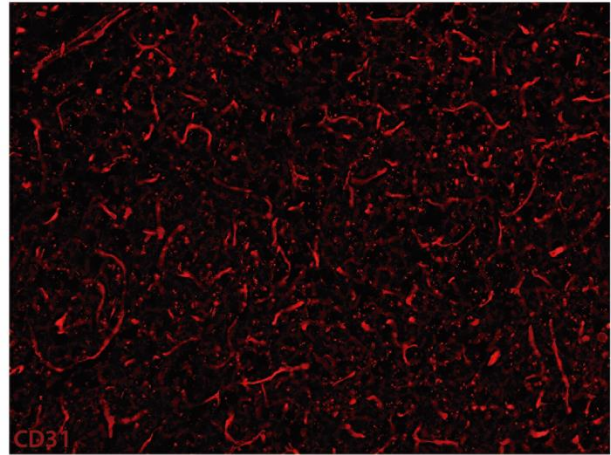
Como se muestra en la figura 9, la Dx dentro del cerebro se distribuye dentro de la vasculatura cerebral. Para comprobarlo, se realizó una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-CD31, un marcador de células endoteliales presentes en la vasculatura cerebral. Se observó que la distribución de la Dx coincide con la distribución de las células CD31+.

A

Dx



CD31



B

Dx-Vasculatura cerebral

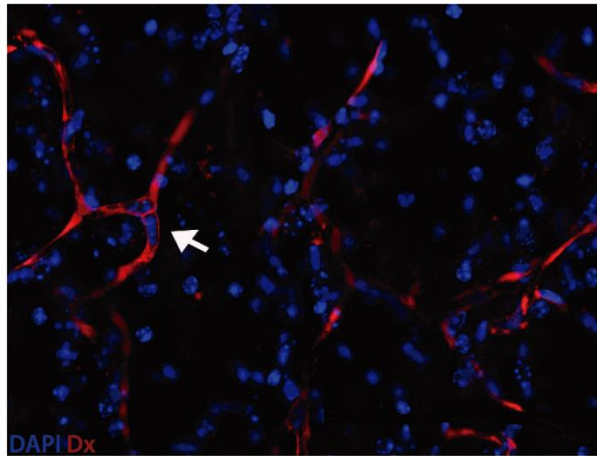


Figura 9. Comparación de la señal de Dx y células CD31+ dentro del cerebro de ratón. **A)** Inmunofluorescencias contra Dx en aumento 10X. Se observa que la Dx adopta una distribución similar a la de las células CD31+, lo que supone una distribución de Dx en vasos sanguíneos. **B)** Micrografía de 40x que muestra la distribución de Dx en vasos sanguíneos.

En la figura 10 se muestra un corte histológico de bulbo olfatorio de ratón en el que se puede percibir que la Dx no solo se distribuye dentro de la vasculatura de la zona, sino que también dentro de distintos tipos celulares. Estos resultados señalan la relevancia de estudiar los diferentes tipos celulares en los que la Dx se había internalizado.

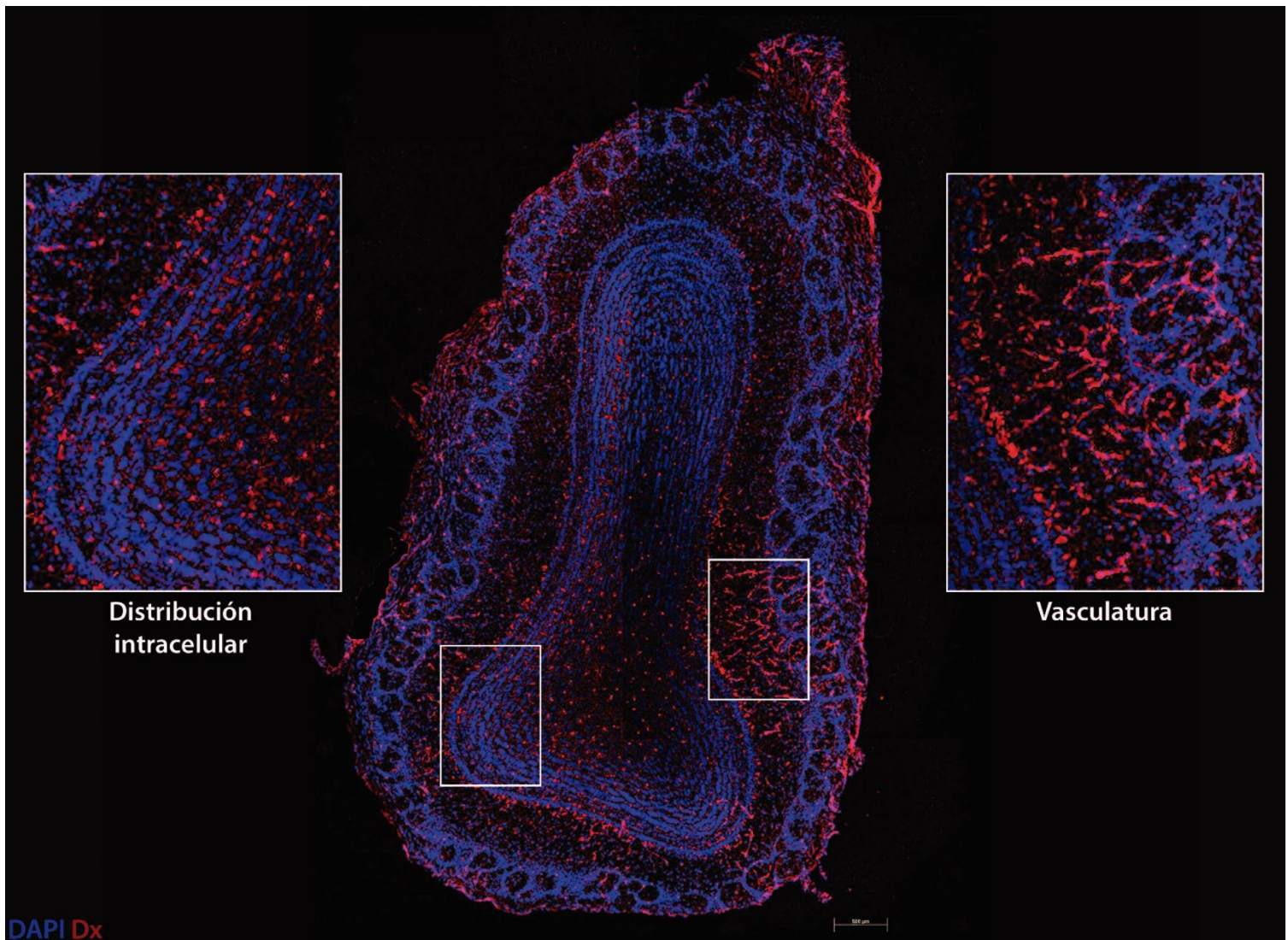


Figura 10. Distribución de Dx en bulbo olfatorio de ratón. **A)** Inmunofluorescencias contra Dx en aumento 4X. Se muestra una reconstrucción de bulbo olfatorio en donde se observa la distribución en general de la Dx en esa región cerebral. **B)** Aumentos a 10x de dos regiones que muestran la distribución de Dx dentro de la vasculatura del bulbo olfatorio, así como de manera intracelular en células locales.

La figura 11 muestra más a detalle, que hay una internalización de la Dx en astrocitos presentes en la región del núcleo estriado del cerebro, así como su distribución dentro del astrocito luego de su análisis por microscopía confocal. De la misma manera, hay una internalización del fármaco en la microglía de la misma zona.

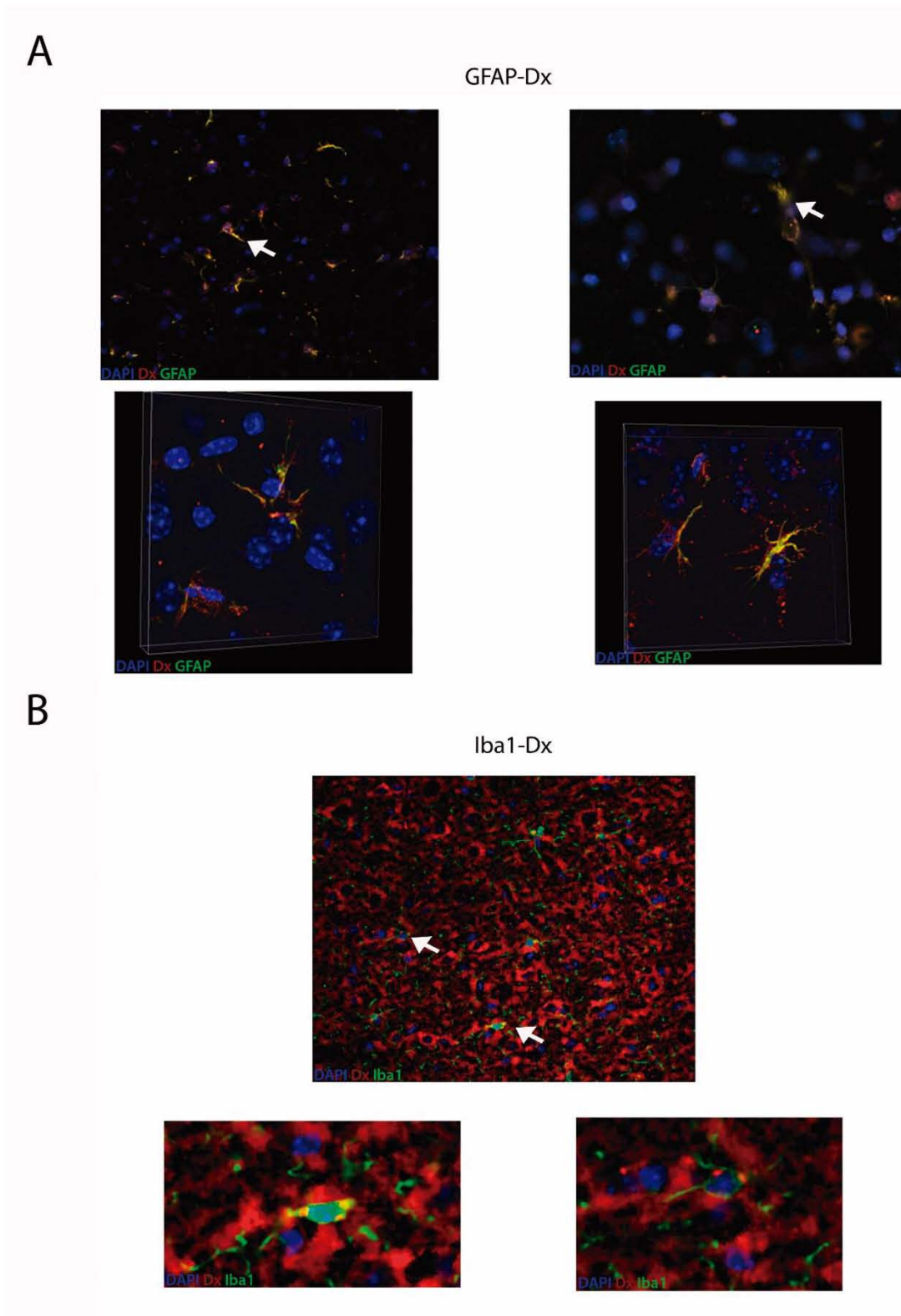


Figura 11. Interacción de Dx con astrocitos y microglía. **A)** En la parte superior inmunofluorescencias contra GFAP y Dx en aumento 20X. Se muestra que los astrocitos internalizan a la Dx. En la parte inferior, aumento digital de 100x de microscopía confocal. En ambos casos en rojo la señal para Dx, verde astrocitos, azul núcleos celulares y amarillo merged entre señal Dx+ y GFAP+. **B)** En la parte superior inmunofluorescencias contra Iba1 y Dx en aumento 10X. Se muestra la Internalización de la Dx por la microglía. En la parte inferior, aumento digital de 100x en microscopía óptica. En ambos casos en rojo la señal para Dx, verde microglía, azul núcleos celulares y amarillo merged entre señal Dx+ e Iba1+.

Para determinar de manera más exacta la distribución del fármaco dentro de las células receptoras, se realizó un análisis por microscopía confocal en el que se encontró que el fármaco se agrupa en pequeñas esferas que a su vez se disponen alrededor del núcleo celular para poder ser translocado al mismo (figura 12).

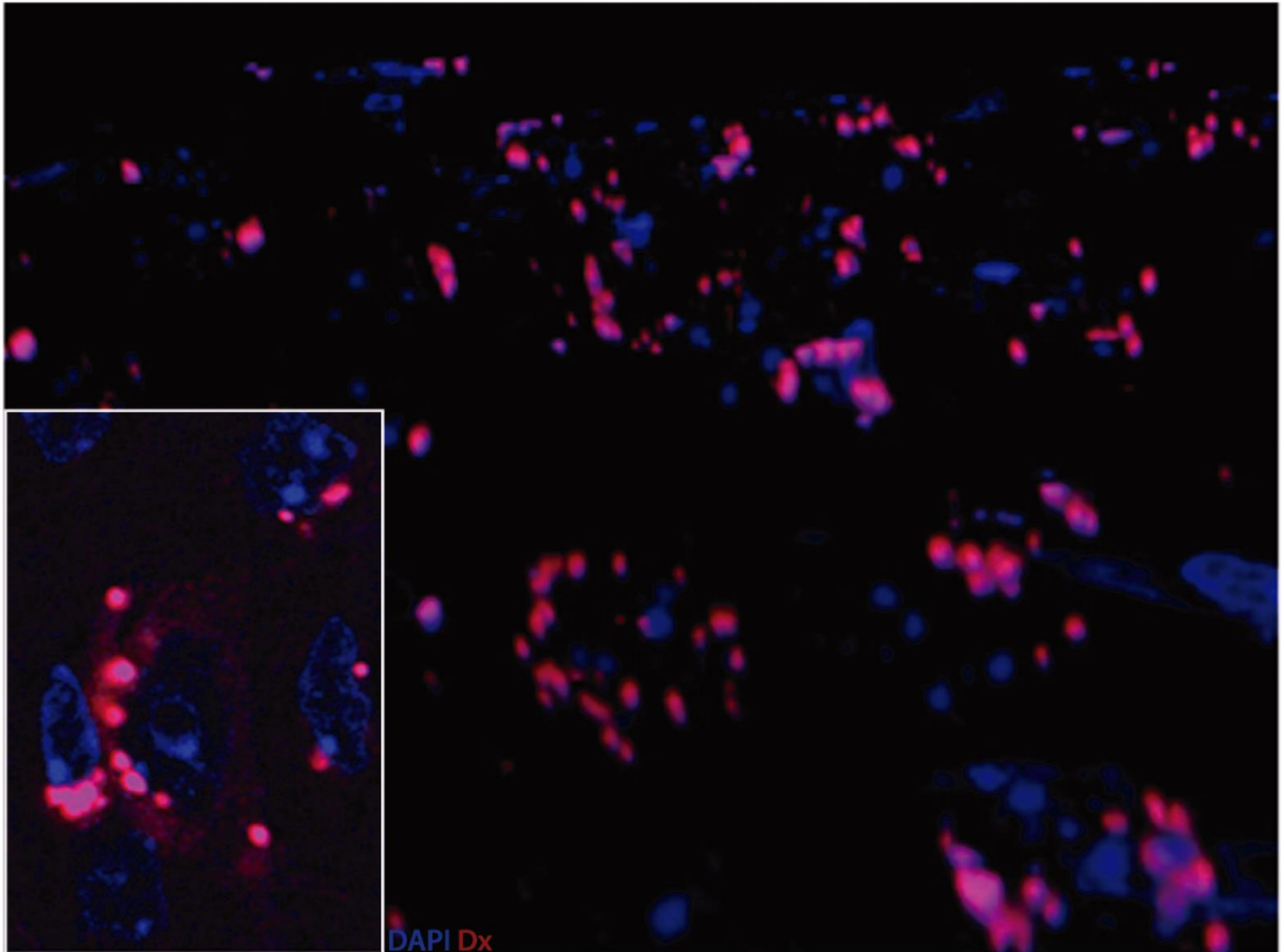


Figura 12. Distribución intracelular general de Dx. Imágenes de microscopía confocal con aumento digital de 100x de la distribución intracelular de la Dx. Se observa que una vez internalizada, la Dx se dispone alrededor del núcleo de la célula receptora.

Discusión

En este trabajo de tesis se aportó información sobre la distribución de la Dx dentro del SNC. Esta información puede ser considerada para dilucidar en futuros estudios los posibles usos del fármaco administrado por vía IN para el tratamiento de diferentes neuropatologías.

Se demostró que la Dx; uno de los GC ampliamente usados para el control de la inflamación, puede alcanzar tanto el cerebro como la médula espinal más eficientemente si es administrada por la vía IN que por la vía IV, en un rango que oscila entre los 200% y 600% más dependiendo de la región analizada (figuras 2 y 3). Esto se debe a que, por esta vía el fármaco no tiene interacción con la BHE, lo que facilita su llegada al SNC. Además, por vía IV el fenómeno denominado como “corona de proteínas” se lleva a cabo en mayor medida comparándolo con la vía IN. En él, diferentes proteínas como albúmina, glicoproteína α -1, diversas lipoproteínas, globulinas α , β y γ se unen a la Dx, lo que disminuye la eficiencia del fármaco, así como su capacidad de llegar al SNC o cualquier órgano diana. En particular en el caso de la Dx, se une inicialmente y en su mayoría a la albúmina y en seguida a lipoproteínas^{22,24,61,81,82}.

Dentro del cerebro el fármaco se distribuye principalmente en las regiones a 1.34, 0.62 y -0.22 mmBrg que incluyen regiones neuroanatómicas como la corteza motriz primaria y secundaria, núcleo estriado, cuerpo caloso y corteza somatosensorial y dentro de ellas el fármaco se dispone en la corteza y núcleo caudado (figura 3). Estudios anteriores demuestran que las moléculas administradas por vía IN pueden dirigirse a través de la vasculatura adyacente a la cavidad nasal así como los nervios trigémino y olfatorio^{21,23,24}.

Considerando la mayor concentración de la Dx en estas regiones, se resalta la posibilidad de utilizar esta vía de administración para el tratamiento de la neuroinflamación en el evento cerebrovascular. Esto debido a que se ha demostrado que estas regiones se ven afectadas por este padecimiento, en particular el núcleo estriado y la corteza motriz^{62,63,64}.

Resulta de especial interés la distribución de la Dx en la médula espinal. Como se observa en la figura 5, hay diferencias significativas tanto en la IFM como el área de cobertura del fármaco, siendo mayores los valores de ambos análisis cuando el fármaco es administrado por vía IN. Esto resulta particularmente relevante ya que se abre la posibilidad de poder utilizar la vía IN para el control de la neuroinflamación en afecciones en la médula espinal de origen traumático, infeccioso o autoinmune ya que previamente se ha reportado que la administración local de GC como la Dx deriva en una mejoría del paciente, contemplando siempre la desventaja de que este tratamiento es bastante invasivo^{65,66}. Estos datos podrían servir para explicar los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación en donde se observó una mejoría en la sintomatología asociada a las recaídas de la EM-RR luego de la administración IN de metilprednisolona. En este caso, se vuelve relevante la presencia del GC en la médula espinal ya que en el modelo murino de EM-RR el daño tisular es principalmente en la médula espinal^{67,68}.

Con el propósito de consolidar los datos previamente obtenidos, se desarrolló en la Unidad de Cromatografía del IIB un método analítico para la cuantificación de Dx en fluidos biológicos, de modo que se pudiera determinar la concentración de Dx en el SNC mediante HPLC. Los resultados concuerdan con los estudios cualitativos previamente presentados. Se observa que a los 15 minutos post-administración, la concentración de Dx en cerebro es elevada y en suero es menor cuando se administra por la vía IN mientras que el efecto es inverso si se administra por vía IV. Esto se debe a

que la llegada del fármaco al SNC, cuando se administra por vía IN, se ve favorecida por la poca interacción del fármaco con la BHE, lo que no sucede cuando es administrado por vía IV ya que por esta vía el fármaco si interacciona con la BHE y tarda más en llegar al SNC. Además, al administrarse por vía IV, la Dx requiere de más tiempo para alcanzar el estado de equilibrio en circulación para después entrar en contacto con la BHE e intentar cruzarla^{25,69,81}. Luego, a los 60 minutos en suero, después de la administración IV, la concentración disminuyó hasta tomar valores semejantes a los observados cuando se administró por vía IN. Esto se puede explicar gracias a que en ese tiempo el fármaco administrado por las dos vías ya está en la circulación sistémica y tiene un mismo metabolismo mayoritario que es en el hígado, lo que puede estandarizar las concentraciones analizadas^{36,54,83,84}. Al final, a los 120 minutos la concentración de Dx administrada por ambas vías disminuyó adoptando valores que no presentaron diferencias significativas entre cada grupo. Esto también se le puede atribuir al metabolismo en el hígado del fármaco^{36,54,83,84}.

Los tiempos en los que se analizó la concentración de Dx por HPLC distan de los utilizados para el análisis por inmunofluorescencia; 15 a 180 minutos y 24 horas post-administración respectivamente, ya que se tiene reportado que el máximo de biodisponibilidad de Dx es entre los 15 y 30 minutos después de haber sido administrada. Lo que se ve de manera cualitativa en las inmunofluorescencias es el fármaco que no está biodisponible, si no el que ya está internalizado en las células ya fue capturado por el receptor de GC. De modo que se puede concluir que la Dx a tiempos cortos estará biodisponible, mientras que cuando ya está metabolizada la concentración a tiempos largos se espera sea baja o nula, sin embargo, es importante señalar que no se midieron metabolitos de excreción de la Dx a ninguno de los tiempos de análisis, de modo que en futuros estudios se debe de realizar la medición de estos metabolitos. Los valores de concentración de Dx mostrados en el presente trabajo coinciden con los reportados previamente en donde el máximo detectado de Dx es a los 30 minutos post-administración, mientras que al paso del tiempo hasta las 10 horas post-administración la concentración llega a 0 ng/ml^{36,53,60}. Se debe resaltar que en ambos casos se llevó a cabo la misma metodología de detección a partir de HPLC con detector de UV, de este modo los resultados están sujetos al límite de detección de este dispositivo, es muy probable que estos datos se modifiquen si se utilizan metodologías de detección con una mayor capacidad de detección.

Las observaciones realizadas en cuanto a la concentración del fármaco se refiere son importantes ya que pueden servir como base para realizar futuros estudios con el fin de disminuir la concentración de fármaco administrada; disminución que siempre estará en función de donde y como sea la actividad del fármaco, y así disminuir también los efectos secundarios que supone una constante administración de elevadas concentraciones de GC, que van desde reacciones simples como enrojecimiento y salpullido hasta complicaciones médicas como predisposición a desarrollar diabetes y osteoporosis o insuficiencia renal y hepática^{37,70,71,72}.

Los resultados obtenidos sobre la distribución de la Dx y su concentración dentro del SNC sugieren la necesidad de analizar de manera *in vivo* la dinámica del fármaco administrado por ambas vías de administración. Para ello se utilizó el sistema de *In vivo* Xtream Brucker®, este sistema permite obtener imágenes de rayos X de los organismos analizados a las cuales se les puede sobreponer imágenes de fluorescencia emitida por algún agente administrado. De este modo, se puede saber en qué región anatómica se encuentran estos agentes fluorescentes a diferentes tiempos. En el caso de este estudio, se observó que, de acuerdo a la escala de color, después de la administración IV de Dx esta empieza a acumularse en el hígado entre los 30 y 45 minutos post-administración. Se ha reportado que en ratas el profármaco éster fosfato de Dx se metaboliza en el hígado y libera Dx de 15 a 30 minutos post-

administración IV^{40,54}, estos datos coinciden con lo observado en el experimento de la figura 7, en donde se observa la acumulación de la Dx acoplada a fluoresceína desde los 30 minutos post-administración, mientras que no se detecta al mismo tiempo acumulación de fármaco al ser administrado por vía IN. Esto sugiere que luego de la administración IN de Dx, esta tarda más tiempo en ser metabolizada en el hígado que si se administra por vía IV.

Por otro lado, la figura 8 muestra las modificaciones en la distribución de la Dx administrada por vía IN. Lo observado coincide con lo previamente reportado por^{24,50,73}, que reporta que las sustancias administradas por vía IN pueden tomar camino hacia el SNC y rumbo al sistema respiratorio, particularmente hacia los pulmones. Así mismo es importante tomar en cuenta los 15 minutos se puede detectar la mayor cantidad de Dx tanto en la región craneal como en la pulmonar, lo que permite inferir el tiempo aproximado en el que la biodisponibilidad de la Dx administrada por vía IN tendría su punto máximo, dato que en la literatura existente no se ha reportado.

Un aspecto más a considerar para caracterizar la distribución de la Dx dentro del SNC es su interacción tejido-específica. Se realizó una inmunofluorescencia contra Dx que se muestra en la figura 9, en ella se muestra que el fármaco estará distribuido en la vasculatura cerebral. Tomando en cuenta lo reportado previamente²⁴; que menciona que una de las vías de llegada al SNC de las sustancias administradas por vía IN es a través de la vasculatura, se realizó una inmunofluorescencia contra endotelio vascular utilizando un anticuerpo contra el marcador celular CD31. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado previamente⁴⁷, en donde se menciona una equivalencia en las marcas fluorescentes de endotelio vascular y la marca de la Dx.

La presencia de la Dx en la vasculatura cerebral aporta información que da fuerza al uso de Dx administrada por vía IN para el control de la neuroinflamación en patologías que estén directamente relacionadas con daño en este tipo de tejidos, así como procesos neuroinflamatorios como pueden ser EVC u otras patologías en donde se vea comprometida la permeabilidad de la BHE por la inflamación prolongada.

La figura 10 muestra una reconstrucción de bulbo olfatorio en donde se observa la distribución del fármaco dentro de la vasculatura de la región y con una distribución intracelular. Esto indica que la Dx se puede encontrar al mismo tiempo en la vasculatura y dentro de diferentes tipos celulares. Ya se ha descrito que los glucocorticoides se internalizan en diferentes tipos celulares como astrocitos, microglía y neuronas, datos obtenidos en experimentos *in vitro*. Para saber cómo es la interacción de la Dx con algunos tipos celulares dentro del SNC de manera *in vivo*; astrocitos y microglía, se realizaron experimentos de inmunodetección contra el fármaco y los tipos celulares señalados. Como se observa en la figura 11, hay una internalización de la Dx en ambos tipos celulares. Esto tiene una injerencia directa en la expresión de cada uno de estos tipos celulares, como en la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, así como en la respuesta a la estimulación por neurotransmisores^{74,75,76,77,78,79,80}. Es importante ampliar la investigación sobre el efecto del fármaco sobre de los astrocitos y la microglía de diferentes regiones cerebrales para poder entonces identificar posibles focos terapéuticos cuyo objetivo sea que la Dx u otros fármacos antiinflamatorios alcancen a estos tipos celulares.

Por último, para tener un acercamiento a cómo es que actúa la Dx una vez que es internalizada a sus células blanco, se realizó un análisis de microscopía confocal, el cual reveló que una vez dentro de las células, la Dx se dispone alrededor y dentro del núcleo. En la figura 12 se muestra que la señal positiva a la Dx se encuentra a manera de “esferas”. Esto podría ser gracias a que el receptor de GC captura la Dx una vez que entra a la célula y en seguida lo lleva al núcleo^{31,39}. Lo que se observa en las

imágenes de la figura 12 es el momento en el que la Dx es translocada al núcleo y cuando está dentro del núcleo.

Conclusiones

En este trabajo se presenta información que permite concluir que la administración IN de Dx favorece a su mayor distribución dentro del SNC en comparación de su administración IV.

Se pudo observar que las regiones cerebrales que incluyen el núcleo estriado y las cortezas somatosensorial y motriz son las únicas con diferencias estadísticamente significativas, lo que podría explicar la recuperación del control motriz en modelos de EVC y EAE.

Con respecto a la biodisponibilidad de la Dx dentro del cerebro es mayor durante los primeros 60 minutos después de haber sido administrada por la vía IN. Aunado a esto, el fármaco aparentemente se distribuye dentro del sistema respiratorio, sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos que corroboren lo observado en este trabajo.

Es importante optimizar la metodología de extracción de Dx a partir de las muestras biológicas, ya que la metodología utilizada ocupa una extracción mecánica y ya se han reportado metodologías enzimáticas que permiten separar el fármaco de proteínas que podrían ser utilizadas, lo que otorgaría una visión más completa de lo que ocurre con la Dx al ser administrada por vía IN e IV con el objetivo de hacerla llegar al SNC. Aunado a esto, se podrían utilizar dispositivos de detección más potentes que el HPLC para descartar que los valores de 0 mg/ml reportados no se deban al límite de detección del dispositivo señalado.

En el análisis *in vivo* aquí realizado, la Dx es internalizada por microglía y astrocitos y se distribuye también en vasos sanguíneos dentro del SNC. Sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan conocer cómo se modifica este fenómeno cuando se trata de ratones pertenecientes a algún modelo experimental y donde se analicen otros tipos celulares residentes o que migran al SNC, como neuronas, células que componen la barrera hematoencefálica o células inmunes como linfocitos.

Bibliografía

1. Escobar, F. *et al.* Administración de medicamentos en vías diferentes de las indicadas en la prescripción médica. *Rev. latino-am Enferm.* **19**, 1–7 (2011).
2. Verma, P., Thakur, A. S., Deshmukh, K., Jha, A. K. & Verma, S. *ROUTES OF DRUG ADMINISTRATION. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research E-ISSN 2229-4619* (2010).
3. Williams, N. T. Medication administration through enteral feeding tubes. *American Journal of Health-System Pharmacy* **65**, 2347–2357 (2008).
4. Magnuson, B. L., Clifford, T. M., Hoskins, L. A. & Bernard, A. C. Enteral nutrition and drug administration, interactions, and complications. *Nutrition in Clinical Practice* **20**, 618–624 (2005).
5. Edouard, A. *et al.* Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ciprofloxacin administered through a nasogastric tube with continuous enteral feeding to critically ill patients. *Intensive Care Med.* **24**, 1047–1051 (2002).
6. Turner, P. V, Pekow, C., Vasbinder, M. A. & Brabb, T. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **50**, 614–27 (2011).
7. Gibaldi, M., Boyes, R. N. & Feldman, S. Influence of First-Pass Effect on Availability of Drugs on Oral Administration. *J. Pharm. Sci.* **60**, 1338–1340 (1971).
8. Sosnik, A., Das Neves, J. & Sarmiento, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science* **39**, 2030–2075 (2014).
9. Kroin, J. S. Intrathecal Drug Administration: Present Use and Future Trends. *Clin. Pharmacokinet.* **22**, 319–326 (1992).
10. Ballard, B. E. Biopharmaceutical considerations in subcutaneous and intramuscular drug administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **57**, 357–378 (1968).
11. Shaw, J. E. & Chandrasekaran, S. K. Controlled topical delivery of drugs for systemic action. *Drug Metab. Rev.* **8**, 223–233 (1978).
12. Mezei, M. & Gulasekharan, V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. *Life Sci.* **26**, 1473–1477 (1980).
13. Davies, N. M. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. in *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **27**, 558–562 (John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 2000).
14. McNeill, S. C., Potts, R. O. & Francoeur, M. L. Local Enhanced Topical Delivery (LETD) of Drugs: Does It Truly Exist? *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **9**, 1422–1427 (1992).
15. Groothuis, D. R. The blood-brain and blood-tumor barriers: A review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro. Oncol.* **2**, 45–59 (2004).
16. Nag, S. & Smith, Q. R. A Review of Blood–Brain Barrier Transport Techniques. in *Blood-Brain Barrier*, 193–208 (Humana Press, 2003). doi:10.1385/1-59259-419-0:193

17. Rubin, L. L. & Staddon, J. M. THE CELL BIOLOGY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 11–28 (2002).
18. Farrall, A. J. & Wardlaw, J. M. Blood-brain barrier: Ageing and microvascular disease - systematic review and meta-analysis. *Neurobiology of Aging* **30**, 337–352 (2009).
19. Khan, A. R., Liu, M., Khan, M. W. & Zhai, G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *Journal of Controlled Release* **268**, 364–389 (2017).
20. Williams, R. O. *et al.* Formulation and device design to increase nose to brain drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **35**, 213–222 (2016).
21. Dhuria, S. V., Hanson, L. R. & Frey, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.* **99**, 1654–1673 (2010).
22. Erdő, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á. & Gizurarson, S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin* **143**, 155–170 (2018).
23. Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G. & Hsu, W. H. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences* **195**, 44–52 (2018).
24. Lochhead, J. J. & Thorne, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 614–628 (2012).
25. Alexander, A. *et al.* Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J. Control. Release* **281**, 139–177 (2018).
26. Kozlovskaya, L., Abou-Kaoud, M. & Stepensky, D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *Journal of Controlled Release* **189**, 133–140 (2014).
27. Illum, L. Nasal drug delivery - Recent developments and future prospects. *Journal of Controlled Release* **161**, 254–263 (2012).
28. Wang, Q., Zuo, Z., Cheung, C. K. C. & Leung, S. S. Y. Updates on thermosensitive hydrogel for nasal, ocular and cutaneous delivery. *Int. J. Pharm.* **559**, 86–101 (2019).
29. Rhen, T. & Cidlowski, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1711–1723 (2005).
30. Serra, H. A., Roganovich, J. M. & Rizzo, L. F. L. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional de lo molecular al uso clinico. *Medicina* **72**, 158-170 (2012).
31. Van Der Velden, V. H. J. Glucocorticoids: Mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators of Inflammation* **7**, 229–237 (1998).
32. Guerrero, J. Para entender la acción de cortisol en inflamación aguda: Una mirada desde la glándula suprarrenal hasta la célula blanco. *Rev. Med. Chil.* **145**, 230–239 (2017).
33. Duval, F., González, F. & Rabia, H. Neurobiología del estrés. *Rev. Chil. Neuropsiquiatr.* **48**, 307–318 (2010).
34. Vega-Rivera, N. M., Fernández-Guasti, J. A., Ramírez-Rodríguez, G. B., Castro-García, M. & Estrada-Camarena, E. Regulación de la neurogénesis hipocámpica por los estrógenos: Su relación con la depresión. *Salud Ment.* **35**, 527–533 (2012).
35. Galofré, J. Manejo de los corticoides en la practica pediátrica. *Rev. Medica Univ. Navarra* **53**, 9–18 (2009).

36. Cubana, R., Sanitario, R., Farmac, G. E., Finlay, C. J. & Hipersensibilidad, C. Dexametasona 8 mg. *Rev. Cuba. Farm.* **45**, 313–317 (2011).
37. Schäcke, H., Döcke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology and Therapeutics* **96**, 23–43 (2002).
38. Baxter, J. D. & Forsham, P. H. Tissue effects of glucocorticoids. *Am. J. Med.* **53**, 573–589 (1972).
39. Liberman, A. C., Druker, J., Refojo, D. & Arzt, E. MECANISMOS MOLECULARES DE ACCION DE ALGUNAS DROGAS INMUNOSUPRESORAS.
40. Corrigan, C. J. & Loke, T. K. Clinical and molecular aspects of glucocorticoid resistant asthma. *Ther. Clin. Risk Manag.* **3**, 771–787 (2007).
41. Necela, B. M. Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**, 239–246 (2004).
42. Barnes. Antiinflammatory actions of glucocorticoids. *J. Biogeogr.* **17**, 315 (1998).
43. Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D. W. & Buttgereit, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* **275**, 71–78 (2007).
44. Song, I. H. & Buttgereit, F. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol. Cell. Endocrinol.* **246**, 142–146 (2006).
45. Makara, G. B. & Haller, J. Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. *Prog. Neurobiol.* **65**, 367–390 (2002).
46. Haller, J., Mikics, É. & Makara, G. B. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 273–291 (2008).
47. Meneses, G. *et al.* Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **190**, (2017).
48. Ocak, E., Acar, B. & Kocaöz, D. Adesão clínica a corticosteroides intranasais em pacientes adultos. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **83**, 558–562 (2017).
49. Gartziandia, O. *et al.* Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Chitosan coated nanostructured lipid carriers for brain delivery of proteins by intranasal administration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **134**, 304–313 (2015).
50. Gizurarson, S. Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery. *Curr. Drug Deliv.* **9**, 566–582 (2012).
51. Shah, B., Khunt, D., Misra, M. & Padh, H. Non-invasive intranasal delivery of quetiapine fumarate loaded microemulsion for brain targeting: Formulation, physicochemical and pharmacokinetic consideration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **91**, 196–207 (2016).
52. Doi, M., Ishida, T., Sugio, S., Imagawa, T. & Inoue, M. Physicochemical properties of dexamethasone palmitate, a high fatty acid ester of an anti-inflammatory drug: Polymorphism and crystal structure. *J. Pharm. Sci.* **78**, 417–422 (1989).
53. Chang-Lin, J. E. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained-release dexamethasone intravitreal implant. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 80–86 (2011).

54. Samtani, M. N. & Jusko, W. J. Comparison of dexamethasone pharmacokinetics in female rats after intravenous and intramuscular administration. *Biopharm. Drug Dispos.* **26**, 85–91 (2005).
55. Yang, L. *et al.* A mouse model for glucocorticoid-induced osteonecrosis: Effect of a steroid holiday. *J. Orthop. Res.* **27**, 169–175 (2009).
56. Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C. A. A. M. & Borst, P. Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J. Clin. Invest.* **96**, 1698–1705 (1995).
57. Marchiori, M. L. *et al.* Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **36**, 962–971 (2010).
58. Li, Z., Wang, F., Roy, S., Sen, C. K. & Guan, J. Injectable, highly flexible, and thermosensitive hydrogels capable of delivering superoxide dismutase. *Biomacromolecules* **10**, 3306–3316 (2009).
59. Rossi, F. *et al.* Tunable hydrogel-Nanoparticles release system for sustained combination therapies in the spinal cord. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **108**, 169–177 (2013).
60. Yuan, Y. *et al.* Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS method for the determination of dexamethasone in nude mice plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* **29**, 578–583 (2015).
61. Meneses, G. *et al.* Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **190**, 304–314 (2017).
62. Yamashita, T. *et al.* Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Migrate and Differentiate into Mature Neurons in the Post-Stroke Adult Striatum. *J. Neurosci.* **26**, 6627–6636 (2006).
63. Darsalia, V., Kallur, T. & Kokaia, Z. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 605–614 (2007).
64. Kojima, T. *et al.* Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* **28**, 545–554 (2010).
65. Baffour, R. *et al.* Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and methylprednisolone on neurological function after experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* **83**, 105–110 (1995).
66. Kim, Y., Caldwell, J.-M. & Bellamkonda, R. V. Nanoparticle-mediated local delivery of methylprednisolone after spinal cord injury. *Biomaterials* **30**, 2582–2590 (2009).
67. Bannerman, P., Hahn, A., Soulika, A., Gallo, V. & Pleasure, D. Astroglia in EAE spinal cord: Derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. *Glia* **55**, 57–64 (2007).
68. Mi, S. *et al.* LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* **13**, 1228–1233 (2007).
69. Lochhead, J. J. & Thorne, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 614–628 (2012).
70. Pozzi, C. *et al.* Corticosteroids in IgA nephropathy: A randomised controlled trial. *Lancet* **353**, 883–887 (1999).

71. Takeda, K., Arase, S. & Takahashi, S. Side Effects of Topical Corticosteroids and their Prevention. *Drugs* **36**, 15–23 (1988).
72. Ghosh, A. & Coondoo, A. Systemic side effects of topical corticosteroids. in *A Treatise on Topical Corticosteroids in Dermatology: Use, Misuse and Abuse* **59**, 241–249 (Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 2017).
73. Grassin-Delyle, S. *et al.* Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration - Focus on opioids. *Pharmacology and Therapeutics* **134**, 366–379 (2012).
74. Ciaranello, R. D. & Axelrod, J. EFFECTS OF DEXAMETHASONE ON NEUROTRANSMITTER ENZYMES IN CHROMAFFIN TISSUE OF THE NEWBORN RAT. *J. Neurochem.* **24**, 775–778 (1975).
75. Slotkin, T. A., Kreider, M. L., Tate, C. A. & Seidler, F. J. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology* **31**, 904–911 (2006).
76. Rock, R. B. *et al.* Mycobacterium tuberculosis– Induced Cytokine and Chemokine Expression by Human Microglia and Astrocytes: Effects of Dexamethasone. *J. Infect. Dis.* **192**, 2054–2058 (2005).
77. Chao, C. C. *et al.* Cytokine Release from Microglia: Differential Inhibition by Pentoxifylline and Dexamethasone. *J. Infect. Dis.* **166**, 847–853 (1992).
78. Brenner, T., Yamin, A., Abramsky, O. & Gallily, R. Stimulation of tumor necrosis factor- α production by mycoplasmas and inhibition by dexamethasone in cultured astrocytes. *Brain Res.* **608**, 273–279 (1993).
79. Riva, M. A., Molteni, R. & Racagni, G. Differential regulation of FGF-2 and FGFR-1 in rat cortical astrocytes by dexamethasone and isoproterenol. *Mol. Brain Res.* **57**, 38–45 (1998).
80. Riva, M. A., Fumagalli, F. & Racagni, G. Opposite Regulation of Basic Fibroblast Growth Factor and Nerve Growth Factor Gene Expression in Rat Cortical Astrocytes Following Dexamethasone Treatment. *J. Neurochem.* **64**, 2526–2533 (1995).
81. Doyle, M. *et al.* Characterization of dexamethasone binding in normal and uremic human serum. *DICP.* **24**, 229-231 (1990).
82. Peets, A., Staub, M. & Symchowics, S. Plasma binding of Betamethasone- ^3H , Dexamethasone- ^3H and Cortisol- ^{14}C . A comparative study. *Biochemical Pharmacology.* **18**, 1655-1663 (1969).
83. FARMACODIVULGACIÓN. Dexametasona 8 mg. *Revista Cubana de Farmacia.* **45 (2)**, 313-317 (2011).
84. Facultad de Medicina UNAM. (2005). Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general a junio de 2005. Ciudad de México, México. Recuperado de http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/62.HTM.

